

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :

C12N 15/86, 7/01, A61K 48/00, C12N
7/04, C07K 14/15

A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 97/19182

(43) Date de publication internationale: 29 mai 1997 (29.05.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01817

(22) Date de dépôt international: 18 novembre 1996 (18.11.96)

(30) Données relatives à la priorité:
95/13676 17 novembre 1995 (17.11.95) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NA-
TIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR];
3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): EPSTEIN, Alberto,
Luis [FR/FR]; 403, avenue du 8-Mai-1945, F-69300 Caluire
(FR). COSSET, François-Loïc [FR/FR]; 32, rue Thévenet,
F-69004 Lyon (FR). SAVARD, Nathalie [FR/FR]; 27,
avenue Saint-Exupéry, F-01200 Bellegarde (FR).

(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves
Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris
(FR).

(81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: PRODUCTION OF RETROVIRAL VECTORS USING HERPES VECTORS

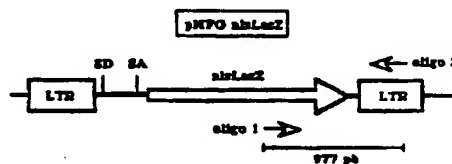
(54) Titre: PRODUCTION DE VECTEURS RETROVIRAUX PAR L'INTERMEDIAIRE DE VECTEURS HERPETIQUES

(57) Abstract

A method for producing retroviral vectors useful for transferring nucleic acid sequences into eukaryotic cells, wherein a eukaryotic cell is infected with at least one herpetic viral vector, is disclosed. The retroviral elements needed to complete the retroviral cycle are provided by the herpetic vector(s) alone or in combination with retroviral elements within the genome of the eukaryotic cell.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé de production de vecteurs rétroviraux aptes pour le transfert de séquences d'acide nucléique dans des cellules eucaryotes, caractérisé par l'infection d'une cellule eucaryote par au moins un vecteur viral herpétique, les éléments rétroviraux nécessaires pour l'accomplissement du cycle rétroviral étant fournis soit par le ou les vecteur(s) herpétique(s), soit par le(s) vecteur(s) herpétique(s) en association avec des éléments rétroviraux compris au sein du génome de la cellule eucaryote.



1	2	3	4	5	6	7	8
MW	PCR (plasmid)	RT-PCR (GPE-usg)	PCR (GPE-usg)	RT-PCR (cell RNA)	PCR (cell RNA)	RT-PCR (bcl2)	RT-PCR (control)

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brézil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

PRODUCTION DE VECTEURS RETROVIRAUX PAR L'INTERMEDIAIRE DE VECTEURS HERPETIQUES

L'invention concerne un procédé de production de vecteurs rétroviraux aptes pour le transfert de séquences d'acides nucléiques dans différents types de cellules et organismes. L'invention concerne également les acides nucléiques et les vecteurs viraux utilisés dans le procédé. Par ailleurs, l'invention vise l'utilisation des vecteurs en thérapie génique et les composants pharmaceutiques correspondants.

Les vecteurs rétroviraux sont souvent utilisés en thérapie génique pour le transfert de gènes dans des cellules et organismes. En effet, grâce à leur activité intégrase, ils permettent le transfert et l'intégration stable d'une séquence codante ou non-codante ayant une taille pouvant aller jusqu'à 7 Kb.

Les vecteurs rétroviraux sont couramment produits à partir de lignées cellulaires encapsidantes (ou transcomplémentantes), dans lesquelles les deux éléments fondamentaux qui permettent la formation du vecteur rétroviral sont intégrés dans les chromosomes cellulaires (figure 1). Ces éléments sont, d'une part, la "composante transcomplémentante", unité transcriptionnelle capable d'exprimer les gènes rétroviraux Gag-Pol-Env (GPE), ou bien Gag-Pol et Env, permettant la synthèse des constituants protéiques de la particule rétrovirale, et d'autre part, la "composante vecteur", unité transcriptionnelle capable d'exprimer et de faire encapsider le "transgène" dans les particules virales formées par la "composante transcomplémentante". Pour cela, le transgène est entouré d'un ensemble de séquences d'origines rétrovirales qui lui permettent d'être encapsidé,

rétrotranscrit puis intégré et exprimé dans les chromosomes cellulaires de la cellule cible.

Les lignées encapsidantes posent cependant de nombreux problèmes : elles produisent des titres trop faibles de vecteurs, dépassant rarement 10^5 pfu/ml. Pour réaliser des protocoles de thérapie génique en utilisant des vecteurs rétroviraux, chez l'homme et même chez des modèles animaux, il faut des quantités de particules rétrovirales autrement plus importantes que celles que l'on est en mesure de produire aujourd'hui en utilisant les méthodes classiques. Cette limitation est d'autant plus grave que les vecteurs rétroviraux ne peuvent pas être concentrés sans perte de pouvoir infectieux.

Par ailleurs, les lignées encapsidantes génèrent souvent des rétrovirus recombinants, qui sont parfois compétents pour la réplication. Ce phénomène est tout à fait indésirable dans un protocole de thérapie génique.

De plus, pour différentes raisons, ces systèmes ne peuvent généralement pas être utilisés pour une production de vecteurs rétroviraux in vivo.

Des procédures de production transitoire ont été également développées : elles se basent toutes sur la cotransfection de différents plasmides portant les différentes composantes d'un vecteur rétroviral. Ces plasmides peuvent parfois être amplifiés dans les cellules, mais ils sont dans tous les cas introduits dans celles-ci par transfection, ce qui limite considérablement leur utilisation et leur efficacité.

Récemment, Flamant et al. (Virology, 211, 234-240, 1995) ont décrit une méthode "one-step" (désignée "virofection") pour la production de vecteurs rétroviraux. La méthode implique la co-transfection d'une cellule eucaryote avec d'une part, un composant rétroviral "vecteur" et d'autre part, un composant rétroviral "transcomplémentant". L'obtention de

vecteurs rétroviraux est décrite. Cette méthode repose néanmoins sur la transfection des cellules, limitant son utilisation et son efficacité.

Le problème que se propose de résoudre la présente invention est donc de fournir une méthode de production de vecteurs rétroviraux permettant l'obtention de vecteurs, à partir d'un grand nombre de types cellulaires différents (même ceux normalement non-infectables par des rétrovirus), à des titres élevés, et réduisant la probabilité de générer des rétrovirus recombinants.

Ces objectifs sont atteints par le procédé de l'invention qui vise la production de vecteurs rétroviraux par l'infection de cellules eucaryotes par des vecteurs viraux comportant, intégrés dans le génome, les éléments nécessaires pour la synthèse d'un vecteur rétroviral.

Le procédé de l'invention repose sur l'utilisation de virus, et notamment de virus herpétique, en tant que source d'ADN. Selon l'invention, au lieu d'être intégrées dans les chromosomes cellulaires, les deux composants rétroviraux "transcomplémentant" et "vecteur" sont introduits dans le génome d'un vecteur viral herpétique sous le contrôle de promoteurs appropriés (figure 2). Les composants rétroviraux (sous forme d'ADN, ou proviral) sont donc transcrits à partir d'éléments génétiques extrachromosomiques (le génome du vecteur viral) et le vecteur rétroviral est assemblé dans la cellule. Celle-ci relâche alors les vecteurs rétroviraux et ils peuvent infecter les cellules avoisinantes.

La technique de l'invention permet d'améliorer la production des vecteurs rétroviraux. Tout d'abord, la productivité des vecteurs rétroviraux est améliorée, car l'infection des cellules avec le vecteur viral à

haute multiplicité d'infection permet d'augmenter la synthèse des protéines rétrovirales. En effet, selon l'invention, les titres de production de vecteurs rétroviraux peuvent être supérieurs à 10^8 pfu/ml, par exemple entre 10^9 et 10^{11} pfu/ml.

De plus, la probabilité de générer des rétrovirus recombinants est fortement réduite puisque la production de vecteurs rétroviraux par l'intermédiaire du vecteur viral n'a lieu que de manière transitoire et/ou inductible.

En outre, cette procédure ouvre la possibilité que les vecteurs rétroviraux soient synthétisés directement in vivo, à l'intérieur de l'organisme receveur, par la simple inoculation, éventuellement localisée, du vecteur viral ; ce dernier infecte les cellules de l'organisme receveur et ces cellules se voient alors produire des vecteurs rétroviraux qui peuvent faire intégrer le transgène dans les cellules avoisinantes. Le procédé permet donc d'infecter, avec les vecteurs viraux, des cellules dans l'organisme animal afin de produire directement les vecteurs rétroviraux in situ, à partir des neurones, myotubes, hépatocytes ou virtuellement tout autre type cellulaire, post-mitotique ou pas. Ceci n'est possible actuellement qu'en réalisant des re-implantations des cellules autologues génétiquement modifiées ex vivo et est limité aux seules cellules capables de réaliser des mitoses. Le procédé de l'invention permet la production de vecteurs rétroviraux dans des cellules qui normalement ne sont pas infectable par des rétrovirus.

Selon l'invention, il a été constaté que toutes les étapes nécessaires à la production de particules rétrovirales (expression, épissage, traduction, modifications post-traductionnelles, assemblage, encapsidation, relâchage de virus) ont lieu correctement dans un contexte d'infection herpétique,

utilisant les produits d'expression codés par le virus herpétique. Les vecteurs herpétiques défectifs permettent donc la synthèse et l'assemblage fonctionnel de toutes les protéines et acides nucléiques nécessaires pour la production de particules infectieuses de virus appartenant à une famille virale distincte.

L'invention concerne un procédé de production de vecteurs rétroviraux aptes pour le transfert de séquences d'acide nucléique dans des cellules eucaryotes, ledit procédé comprenant l'introduction dans une cellule eucaryote d'au moins un composant rétroviral dit "vecteur" et/ou d'au moins un composant rétroviral dit "transcomplémentant", le composant vecteur comportant, outre la séquence à transférer, les signaux agissant en cis nécessaires pour l'accomplissement du cycle rétroviral, et le composant transcomplémentant comportant les séquences agissant en trans nécessaires pour l'accomplissement du cycle rétroviral, ledit procédé étant caractérisé en ce que l'introduction du ou des composant(s) rétroviral(aux) dans la cellule est effectuée par l'infection de la cellule par au moins un vecteur viral dérivé d'un virus à ADN double brin, notamment herpétique, et contenant, intégré(s) dans son génome, ledit ou lesdits composant(s) rétroviral(aux), la cellule eucaryote étant alors capable de synthétiser et de relâcher des vecteurs rétroviraux.

En d'autres termes, le procédé de l'invention comprend, ou consiste en, l'infection d'une cellule eucaryote par au moins un vecteur viral, de préférence herpétique, les éléments rétroviraux nécessaires pour l'accomplissement du cycle rétroviral étant fournis soit par le ou les vecteur(s) herpétique(s), soit par le(s) vecteur(s) herpétique(s) en association avec des

éléments rétroviraux compris au sein du génome de la cellule eucaryote.

Normalement, le vecteur viral contient un composant rétroviral "vecteur" (c'est-à-dire un ou plusieurs éléments d'origine rétrovirale) et/ou un composant rétroviral "transcomplémentant".

Selon cette variante, l'invention concerne un procédé de production de vecteurs rétroviraux aptes pour le transfert de séquences d'acide nucléique dans des cellules eucaryotes, ledit procédé comprenant l'introduction dans une cellule eucaryote d'au moins un composant rétroviral dit "vecteur" et/ou d'au moins un composant rétroviral dit "transcomplémentant", le composant vecteur comportant, outre la séquence à transférer, tous les signaux agissant en cis nécessaires pour l'accomplissement du cycle rétroviral, et le composant transcomplémentant comportant les gènes rétroviraux gag, pol et env et étant dépourvu de signal d'encapsidation rétroviral, ledit procédé étant caractérisé en ce que l'introduction du ou des composant(s) rétroviral(aux) dans la cellule est effectuée par l'intermédiaire d'au moins un vecteur viral dérivé d'un virus à ADN double brin, notamment un vecteur herpétique, capable d'infecter la cellule et contenant, intégré(s) dans son génome, ledit ou lesdits composant(s) rétroviral(aux), la cellule eucaryote étant alors capable de synthétiser et de relâcher des vecteurs rétroviraux.

Dans le contexte de l'invention, l'expression "vecteur rétroviral" signifie un rétrovirus recombinant, (qui peut être déficient pour la réplication), c'est-à-dire une molécule d'ARN portant une ou plusieurs séquence(s) à transférer ainsi que les signaux rétroviraux de rétrotranscription, intégration, transcription et encapsidation, cette molécule étant

encapsidée dans une particule rétrovirale. Le vecteur rétroviral est normalement incapable de se répliquer.

Le terme "vecteur viral" signifie un vecteur herpétique (qui peut être déficient), c'est-à-dire une molécule d'ADN portant les signaux nécessaires à la réplication, à la transcription et à l'encapsidation, cette molécule étant encapsidée dans une particule virale typique d'un virus à ADN. Le vecteur est incapable de se répliquer en dehors d'un système (viral ou cellulaire) transcomplémentant. « Vecteur herpétique » signifie un vecteur dérivé d'un virus de la famille des Herpesviridae.

Les termes "les signaux agissant en cis nécessaires pour l'accomplissement du cycle rétroviral" signifient les signaux rétroviraux nécessaires à l'encapsidation, la rétrotranscription, l'intégration et la régulation de la transcription/expression.

Les séquences agissant en trans sont celles codant pour les protéines rétrovirales, par exemple les gènes gag, pol et env.

Les séquences agissant en cis et celles agissant en trans sont normalement comprises au sein de deux unités de transcription indépendantes. Dans ce cas, les unités de transcription peuvent, à leur tour, être comprises, soit dans les génomes de deux vecteurs herpétiques différents, soit dans le génome d'un seul vecteur herpétique. Il est également possible que certaines des séquences agissant en trans (par exemple gag-pol) soient incluses dans la même unité de transcription que celle codant pour les composants rétroviraux agissant en cis.

Selon le procédé de l'invention, les vecteurs viraux sont déficients, apathogènes et n'induisent pas la mort cellulaire rapide, ni ne donnent lieu à la production des virus à ADN, en dehors d'un système (viral ou cellulaire) transcomplémentant.

Le génome des vecteurs viraux de l'invention comporte d'une part des séquences propres à un virus à ADN, et d'autre part des séquences propres à un rétrovirus. Normalement, les séquences génomiques propres à un virus à ADN double brin incluent au moins une séquence d'encapsidation et une origine de réplication.

Lorsque les séquences propres au virus d'ADN ne correspondent pas à la totalité du génome mais incluent au moins les séquences d'encapsidation et l'origine de réplication, le génome du vecteur viral est en fait plasmidique. Le plasmide comprend, en outre, des séquences d'origine bactérienne permettant son clonage et sa sélection dans un hôte bactérien, par exemple E. coli, notamment une origine de réplication et un gène de sélection. Le vecteur viral, souvent appelé "amplicon", est alors un concatamère composé de répétitions du plasmide linéarisé et encapsidé.

Selon une approche alternative, le génome du vecteur viral peut contenir la totalité du génome du virus à ADN, à l'exception d'au moins un gène essentiel, pour la réplication. Dans ce cas, le vecteur viral est réellement un virus recombinant défectif.

Les virus à ADN qui forment la base des vecteurs viraux de l'invention sont choisis parmi tous les virus à ADN double brin capable d'infecter des cellules animales et de préférence de vertébrés. Les virus herpétiques sont particulièrement préférés.

Les virus herpétiques susceptibles d'être utilisés selon l'invention, comprennent tous les membres de la famille des Herpesviridae. Il peut s'agir d'alphaherpesvirinae, de betaherpesvirinae ou de gammaherpesvirinae.

Les virus herpétiques préférés sont d'origine humaine ou animale, par exemple HSV-1, HSV-2, le virus cytomégalique humain (HCMV), les virus humains HHV-6 et

HHV-7, le virus d'Epstein-Barr, le virus Varicella Zoster (VZV), ou le virus de la pseudoréproge porcine (PRV), ou encore le BHV-1 (Bovine Herpes Virus) ou le EHV-1 (Equine Herpes virus) etc.

Les virus herpétiques sont particulièrement préférés en raison de leur grande taille (génomme de 120 à 200 Kb environ) permettant l'inclusion de séquences hétérologues de taille importante. De plus, leur spectre d'hôtes cellulaire est très large. Certains virus de cette famille sont neurotropes, permettant l'infection de cellules nerveuses, tissus que ne peuvent atteindre le rétrovirus. Cette propriété est donc particulièrement avantageuse dans la thérapie génique de maladies nerveuses du CNS. D'autres membres de la famille des virus herpétiques sont lymphotropes. Ces virus peuvent être rendus défectifs par la délétion ou l'inactivation d'au moins un gène essentiel tel le gène IE3 chez HSV-1 ou leurs homologues chez d'autres virus herpétiques.

Comme exemple de virus susceptibles d'être utilisés comme vecteur viral, on peut également citer les adénovirus et les pox-virus.

Les adénovirus, par exemple ceux du groupe C ou autres, peuvent également être utilisés. Ces virus ont une taille moins importante que celles des virus herpétiques (un génome d'environ 35 à 40 Kb). Ils ont un tropisme naturel pour l'épithélium respiratoire, la cornée et le tractus digestif. Ces virus peuvent être rendus défectifs par la délétion de tout ou partie des gènes régulateurs E1A et E1B.

Les poxvirus peuvent également être mis en oeuvre dans la construction de vecteurs viraux selon l'invention. Ces virus ont une taille génomique d'environ 120 à 300 Kb. Ils ont un spectre de cellules hôtes large. Parmi cette famille de virus, le virus de la vaccine est préféré.

Selon l'invention, le vecteur viral comprend dans son génome, outre les séquences propres au virus à ADN décrit ci-dessus, des séquences d'origine rétrovirale c'est-à-dire un "composant rétroviral" qui comprend en particulier, au moins une unité de transcription rétrovirale.

Dans le contexte de l'invention, l'expression "unité de transcription rétrovirale" signifie une séquence d'ADN, comprenant un premier élément constitué des séquences régulatrices nécessaires à la transcription et un deuxième élément constitué d'au moins une séquence à transcrire, l'un ou l'autre de ces éléments étant au moins en partie d'origine rétrovirale. De préférence, l'élément d'origine rétrovirale correspond soit à la partie du génome rétroviral agissant en cis, soit à la partie du génome rétroviral agissant en trans pour l'accomplissement du cycle rétroviral.

Plus particulièrement, l'une des unités de transcription rétrovirale (dit "unité de transcription transcomplémentante") comporte des séquences codant pour les protéines Gag, Pol et/ou Env sous le contrôle de séquences régulatrices fonctionnelles dans la cellule eucaryote. Il est possible d'introduire des variantes des gènes gag, pol et env, ces variantes comportant des substitutions, délétions ou insertions de nucléotides par rapport aux gènes sauvages, à condition que les fonctions essentielles des protéines soient maintenues. Ces fonctions sont les suivantes : gag code pour le précurseur des protéines de capsid ; pol donne lieu à la transcriptase inverse et à une enzyme impliquée dans l'intégration provirale et env code pour le précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe.

Il est possible d'inclure le gène env sur une unité de transcription indépendante de celle contenant

gag et pol. Cette unité de transcription indépendante peut elle-même être incluse dans la même molécule d'ADN et par conséquent dans le même vecteur viral, ou peut en revanche être incluse dans un vecteur viral séparé.

Les séquences régulatrices mises en oeuvre dans l'unité de transcription transcomplémentante comprennent des séquences d'initiation et de terminaison de transcription, fonctionnelles dans la cellule hôte. Ces séquences peuvent être d'origine animale ou virale. Comme promoteur, on peut citer des promoteurs fort et constitutif, par exemple le promoteur HCMV, le promoteur du gène herpétique IE3, ou celui de la thymidine kinase herpétique. On peut également avoir recours à des promoteurs spécifiques de tissus ou à des promoteurs inductibles. Comme exemple de promoteur spécifique de tissu, on peut citer le promoteur du préproenkephaline, le promoteur de l'énolase-neurospécifique, et les promoteurs de n'importe quel gène s'exprimant dans un tissu particulier. Comme exemple de promoteur inductible, on peut citer les promoteurs des protéines de choc thermique, etc..

L'unité de transcription "vecteur" comporte :

- une séquence dite "hétérologue" sous le contrôle de séquences régulatrices de transcription, fonctionnelles dans la cellule eucaryote ;
- une séquence d'origine rétrovirale permettant l'encapsidation du transcrit et sa rétrotranscription ;
- au moins une partie des LTR 5' et 3' d'un rétrovirus, ladite partie conférant la capacité d'encapsidation, de rétrotranscription et d'intégration.

La séquence "hétérologue" comprise au sein de cette unité de transcription peut être toute séquence dont le transfert dans la cellule ou organisme cible est désiré. Il s'agit de toute séquence transcriptible

codant pour une ou plusieurs protéine(s) ou pour une partie d'une protéine, ou qui donne lieu, après transcription, à une séquence complémentaire d'un produit de transcription endogène ou exogène à la cellule, par exemple complémentaire d'une séquence virale. La séquence hétérologue est normalement d'origine non-rétrovirale et peut comprendre une ou plusieurs séquence(s) codante(s) ou non-codante(s), ou un mélange des deux. Elle peut être hétérologue ou homologue vis-à-vis de la cellule et hétérologue ou homologue vis-à-vis du vecteur. La séquence hétérologue peut aussi être désignée "transgène". La taille de la séquence hétérologue doit être compatible avec l'encapsidation des particules rétrovirales (environ 7 Kb).

La séquence hétérologue est souvent une séquence dont le produit de transcription ou de traduction exerce un effet thérapeutique dans une cellule ou dans un organisme. Comme exemple de séquences hétérologues, on peut citer un gène thérapeutique de maladie à caractère mono- ou multigénique, un gène codant pour une cytokine, un gène suicide, un gène suicide conditionnel, un gène à activité antivirale, un gène à activité antitumorale, un gène thérapeutique de maladie neurodégénérative, ou un gène marqueur.

Plus particulièrement, la séquence hétérologue peut être une séquence codant pour une enzyme, un dérivé sanguin, une hormone, une lymphokine (interleukines, interférons, INF etc.), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs, la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, la thymidine kinase, la cytosine déaminase. Il peut s'agir d'une protéine antigénique capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire.

La séquence hétérologue peut aussi donner lieu, après transcription, à une séquence antisense ou à un ribozyme.

Il est également possible d'utiliser des séquences hétérologues codant pour des marqueurs cellulaires. Ces séquences peuvent être employées seules ou en association avec une autre séquence hétérologue.

Selon une variante de l'invention, il est possible d'inclure dans l'unité de transcription "vecteur", une partie du gène rétroviral gag pour améliorer l'encapsidation du transcrit. Il s'agit normalement d'un fragment d'environ 600 nucléotides à partir du codon initiateur de gag.

Il est également possible d'inclure dans l'unité de transcription « vecteur », une partie des composants rétroviraux agissant en trans, par exemple gag-pol.

Pour cette unité de transcription, les séquences régulatrices de la transcription peuvent être celles présentes au sein des LTR rétroviraux ou peuvent être apportées par d'autres séquences. Il est donc possible d'inclure tout autre promoteur, fort, constitutive, spécifique de tissu ou inductible, à condition d'être fonctionnel dans la cellule hôte.

Il est néanmoins important d'inclure dans cette unité de transcription toutes les séquences rétrovirales permettant l'encapsidation, la rétrotranscription et l'intégration. Ces séquences se trouvent en partie au sein des LTR. D'autres séquences qui se trouvent le long du génome rétroviral sont aussi indispensables pour l'encapsidation (signaux appelés "ψ") et la rétrotranscription.

Les séquences rétrovirales mises en oeuvre dans les vecteurs de la présente invention proviennent d'un ou plusieurs rétrovirus, par exemple MoMLV, RD114, BaEV, MLV-A ; des rétrovirus de mammifères de type D,

par exemple MPMV, SRV ; Spuma rétrovirus, par exemple HFV ; HIV, SIV, ASLV.

Les caractéristiques d'enveloppe, et donc le spectre d'hôtes cellulaires, sont largement déterminées par la nature de Env. Selon l'invention, il est possible de choisir l'origine de Env pour obtenir les caractéristiques souhaitées. Gag, Pol et Env peuvent provenir du même rétrovirus, par exemple MoMLV. Dans ce cas, l'enveloppe du vecteur rétroviral est écotrope. Le gène Env du virus MoMLV peut être remplacé aisément par tous les gènes Env des virus mammifères de type C (amphotrope, xénotrope, RD114) ou encore par le gène Env d'autres rétrovirus non apparentés, incluant le virus HIV, ou encore par des gènes codant pour des enveloppes non-rétrovirales, par exemple VSV-G. Il en va de même pour les gènes Gag-Pol. Ceci permet au système de s'adapter aisément à une grande diversité de situations rencontrées dans les applications potentielles.

Pour le traitement de maladies d'origine rétrovirale telle que le SIDA, il est possible d'utiliser Gag, Pol et Env du rétrovirus en question, par exemple HIV, afin que le vecteur rétroviral atteigne les cellules infectées. Le choix approprié de virus à ADN comme vecteur viral, et le choix d'éléments rétroviraux, confère une très grande souplesse au système de transfert de gène de l'invention.

Le type de cellule susceptible d'être infectée par les vecteurs de l'invention varie selon le choix du vecteur viral. Normalement, il s'agit d'une cellule de vertébré, plus particulièrement de mammifère, par exemple des cellules de lignéage hématopoiétiques, cellules souches y compris des cellules souches fibroblastiques, épithéliales, hématopoiétiques et nerveuses, ou des cellules différenciées d'origine ectodermique, mésodermique ou endodermique.

La production de vecteurs rétroviraux selon l'invention peut avoir lieu in vivo, ex vivo ou in vitro.

Pour la production de vecteurs rétroviraux in vivo, ex vivo et in vitro, l'on introduit dans la cellule eucaryote à la fois un élément ou des éléments rétroviral(aux) vecteur(s) et un élément ou des éléments rétroviral(aux) transcomplémentant(s), ces différents composants rétroviraux étant compris, soit dans les génomes de deux vecteurs viraux différents, soit dans le génome d'un seul vecteur viral.

Si les composants rétroviraux sont compris au sein du même vecteur viral, il est recommandé d'utiliser, pour la construction du vecteur viral, un virus à ADN de grande taille, par exemple un virus herpétique ou un poxvirus. Selon cette variante, le vecteur viral est de préférence de type "virus recombinant" et non pas de type "plasmide encapsidé" (souvent appelé "amplicon").

Il est également possible de mettre en oeuvre un autre protocole selon lequel l'on introduit dans la cellule eucaryote, par le biais du vecteur viral, un seul composant rétroviral. Ce composant peut être le composant vecteur ou le composant transcomplémentant, la cellule eucaryote ayant déjà, intégré dans son génome, l'autre des deux composants. Cette variante de l'invention met donc en oeuvre des cellules eucaryotes apportant elles-mêmes le composant complémentaire. Cette variante du procédé peut être utilisée in vivo, ex vivo ou in vitro. In vivo, elle permet de « remobiliser » un vecteur rétroviral déjà intégré dans les génomes d'une population de cellules.

Le procédé in vitro comprend normalement une étape de récupération, et éventuellement de purification, des vecteurs rétroviraux ainsi obtenus. La purification peut être faite par exemple par

filtrage du surnageant des cellules, le filtre laissant passer les vecteurs et retenant tout le matériel indésirable.

Outre le procédé de production de vecteurs rétroviraux, l'invention vise également les molécules d'ADN utilisées pour la construction des vecteurs viraux et les vecteurs viraux et rétroviraux ainsi obtenus.

Les molécules d'ADN de l'invention comprennent des séquences propres au génome d'un virus à ADN double brin et incluant au moins un signal d'encapsidation et une origine de répllication, et au moins une unité de transcription rétrovirale telle que définie précédemment.

Plus particulièrement, ces molécules comprennent :

I : au moins un signal d'encapsidation et une origine de répllication d'un virus à ADN, de préférence herpétique, et

II : au moins un composant rétroviral constitué de :

i) au moins une unité de transcription dite "unité transcomplémentante" comportant des séquences codant pour les protéines rétrovirales Gag, Pol et/ou Env, sous le contrôle de séquences régulatrices de transcription, fonctionnelles dans une cellule eucaryote, cette unité de transcription étant dépourvue de signaux d'encapsidation rétroviraux et de LTR rétroviraux, et/ou

ii) une unité de transcription dite "unité vecteur" comportant :

- une séquence dite "hétérologue" sous le contrôle de séquences régulatrices de transcription, fonctionnelles dans la cellule eucaryote ;
- une séquence d'origine rétrovirale permettant l'encapsidation du transcrit et sa rétrotranscription ;

- au moins une partie des LTR 5' et 3' d'un rétrovirus, ladite partie conférant la capacité d'encapsidation, de rétrotranscription et d'intégration.

Les différentes variantes selon cet aspect de l'invention sont décrites précédemment et comprennent notamment des modes de réalisation préférés en ce qui concerne la nature des différentes séquences.

L'invention vise également les cellules eucaryotes infectées par un ou plusieurs vecteurs viraux de l'invention. Ces cellules peuvent être in vivo ou des cultures cellulaires in vitro.

Selon une variante préférée de l'invention, les vecteurs viraux sont utilisés en thérapie génique. L'invention vise, par conséquent, une composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur viral de l'invention en association avec un véhicule acceptable du point de vue physiologique.

La composition comprend souvent deux vecteurs viraux, l'un de type "transcomplémentant" et l'autre de type "vecteur". Les compositions peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intracrânienne etc..

De préférence, la composition pharmaceutique comprend un véhicule approprié pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc.. ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses des vecteurs viraux utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de

différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, de la séquence hétérologue à exprimer ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les vecteurs viraux selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de vecteur, et est déterminé selon des techniques classiques par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 3 à 5 jours, du nombre de plages de cellules infectées.

De préférence, les préparations virales de l'invention sont dépourvues de virus auxiliaire, ou contiennent une proportion minoritaire de virus auxiliaire.

Les vecteurs viraux de l'invention peuvent être utilisés dans le traitement d'un grand nombre de pathologies, par exemple les cancers, les maladies d'origine virale (SIDA, hépatites, etc..), les maladies à caractères mono- ou multigénique (dystrophie, fibrose kystique etc..), les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, ALS, etc..).

L'invention vise également un procédé pour obtenir l'expression d'une séquence d'acide nucléique dans une cellule eucaryote, notamment à partir des chromosomes de celle-ci, ce procédé comprenant l'infection d'une première cellule eucaryote par au moins un vecteur viral selon l'invention, cette cellule étant alors capable de synthétiser et relâcher des vecteurs rétroviraux, et l'infection d'une deuxième cellule eucaryote par les vecteurs rétroviraux ainsi obtenus. Ce procédé peut être effectué in vivo ou in vitro.

L'invention vise également un procédé de production de vecteurs viraux. Ce procédé varie selon la nature de la molécule d'ADN de départ, c'est-à-dire qu'il s'agit d'une molécule qui ne comprend pas la totalité du génome d'un virus d'ADN mais qui comprend au moins les signaux d'encapsidation et l'origine de réplication (approche "amplicon"), ou s'il s'agit d'une molécule qui correspond à la totalité du génome d'un virus recombinant défectif (approche "virus recombinant").

Pour l'approche "amplicon", le procédé de production du vecteur viral comprend les étapes suivantes :

- a) la transfection d'une cellule eucaryote avec un plasmide contenant i) une partie du génome d'un virus à ADN double brin, cette partie incluant au moins les signaux d'encapsidation et une origine de réplication, et ii) une unité de transcription telle que définie précédemment, et
- b) surinfection de la cellule eucaryote avec un virus à ADN auxiliaire, les étapes a) et b) pouvant être remplacées par la co-transfection du plasmide avec le génome du virus auxiliaire,
- c) récupération des vecteurs viraux produits par la cellule.

Pour l'approche "virus recombinant", le procédé de production des vecteurs viraux comprend les étapes suivantes :

- a) la transfection d'une cellule eucaryote avec un plasmide contenant i) une unité de transcription rétrovirale telle que définie précédemment, et ii) de part et d'autre de cette unité de transcription, des séquences permettant la recombinaison homologue de l'unité avec le génome d'un virus à ADN, et

b) surinfection de la cellule avec le virus à ADN, les étapes a) et b) pouvant être remplacées par la co-tansfection du plasmide avec le génome du virus à ADN, c) récupération des vecteurs viraux produits par la cellule. Il est également possible de produire le vecteur viral par recombinaison spécifique de site en utilisant un système tel que le système Cre/Lox P du phage P1, par exemple.

Différents aspects de l'invention sont illustrés dans les figures :

Figure 1 : Stratégie classique de construction de vecteurs rétroviraux.

Figure 2 : Stratégie de construction in vivo et in vitro de vecteurs rétroviraux selon l'invention.

Figure 3 : Plasmides amplicons pA-HCMV-GPE et pA-VCT.
TRANSG = transgène ; VCT = vecteur.

Figure 4 : Préparation du vecteur transcomplémentant pA-HCMV-GPE/D30EBA.

Figure 5 : Protocole expérimental décrit dans les exemples.

Figure 6 : Des cellules NIH3T3 sont infectées par le surnageant de cellules TE/LacZ. Ces dernières cellules avaient été infectées pendant 48 Heures (a) par le virus D30EBA seul ou (b) par le vecteur pA-HCMV-GPE/D30EBA. Les foyers de cellules bleues montrent que les vecteurs rétroviraux s'intègrent correctement dans l'ADN cellulaire.

Figure 7 : Production de vecteurs rétroviraux par le vecteur pA-HCMV-GPE/D30EBA. Des cellules NIH3T3 ont été infectées par le surnageant de cellules TE/LacZ. Ces dernières cellules avaient été infectées pendant 24 ou

48 Heures par 3, 6, 12 et 24 μ l de vecteurs pA-HCMV-GPE/D30EBA. Aucun vecteur rétroviral n'est détecté après infection de cellules TE/LacZ par le virus D30EBA seul (voir "Protocole expérimental" figurant dans les exemples).

Figure 8 : Détection par RT-PCR du génome du vecteur rétroviral.

Pistes 5 et 6 : ARN total extrait de cellules TE-lac2 ;
Pistes 3 et 4 : surnageants prélevés de cellules TE-lac2 infectées par l'amplicon-GPE ;

Piste 7 : surnageants prélevés de cellules TE-lac2 infectées par le virus auxiliaire D30EBA ;

Piste 8 : surnageants prélevés de cellules TE-lac2 non-infectées (témoin) ;

Piste 2 : plasmide utilisé pour construire les cellules TE-lac2 ;

Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire.

Figure 9 : Cellules NIH3T3 infectées par les surnageants de cellules TE-lac2 infectées par amplicon-GPE. Pistes 2 à 5 : la population de amplicons-GPE a été mise en contact avec des anticorps anti-HSV-1 neutralisants (piste 2), avec des anticorps non-spécifiques de HSV-1 (lane 3), avec des anticorps spécifiques du MoMLV (piste 4), avec des anticorps spécifiques du virus RD114 (lane 5), avant d'infecter les cellules TE-lac2. Pistes 6 et 7 : les surnageants prélevés de cellules TE-lac2 infectées par amplicon-GPE, ont été mis en contact avec des anticorps spécifiques du MoMLV (piste 6) ou du virus RD114 (piste 7), avant d'infecter des cellules NIH3T3. Piste 1 : sans addition d'anticorps.

Figure 10 : Plasmide amplicon pA-IRVlacZ.

Figure 11 : Test X-gal effectué sur des cellules NIH3T3 infectées par le surnageant de cellules TE-GPE infectées par pA-IRV-LacZ/D30EBA.

EXEMPLES

I. Production de vecteurs rétroviraux par infection de cellules TE-lac2 par le vecteur herpétique transcomplémentant pA-HCMV-GPE/D30EBA :

Les inventeurs ont d'abord construit un plasmide amplicon, appelé pA-HCMV-GPE, qui, outre les séquences bactériennes et herpétiques mentionnées plus haut, porte la composante transcomplémentante rétrovirale : l'unité de transcription Gag-Pol-Env (écotrope) du rétrovirus de MoMLV (écotrope : n'infecte que les cellules de rongeurs), exprimée sous contrôle du promoteur HCMV (promoteur très précoce du virus cytomégalique humain) et possédant le signal de polyadénylation de la thymidine kinase (TK) herpétique (figure 3). Cette unité de transcription ne possède aucune LTR, le signal d'encapsidation a été préalablement délété, et, une fois introduite dans un vecteur herpétique, devrait théoriquement s'exprimer comme un gène herpétique très précoce.

Il a été démontré que cette unité de transcription est bien fonctionnelle car, après transfection du plasmide dans des cellules contenant la composante vecteur (cellules TE-lac2, exprimant constitutivement l'ARN génomique d'un vecteur rétroviral portant le gène lacZ), ces cellules se mettent à produire des vecteurs rétroviraux.

Le virus herpétique auxiliaire utilisé pour préparer les populations d'amplicons pA-HCMV-GPE est lui-même défectif (le vecteur amplicon est donc produit

dans des cellules transcomplémentantes), afin de ne pas contaminer les éventuelles préparations de vecteurs rétroviraux avec des virus herpétiques. En particulier, les inventeurs ont utilisé la souche herpétique HSV-1 D30EBA, déficiente pour le gène essentiel IE3, et les cellules E5 ou M64A, qui contiennent et expriment le gène IE3, permettant donc la multiplication du virus herpétique déficient (figure 4).

Cellules :

Les lignées cellulaires utilisées sont : des lignées cellulaires qui transcomplémentent le gène IE3 absent dans le virus D30EBA, par exemple E5 (1) et M64A (12) ; les cellules TE-lac2 (2), les cellules TE-GPE (3) et les cellules NIH3T3. Toutes ces lignées cellulaires sont multipliées dans du milieu DMEM (GIBCO) contenant 10 % serum de veau foetal décomplémenté (FCS) (GIBCO).

Virus et mode d'infection :

Le virus HSV-1 D30EBA (4) est produit à faible multiplicité d'infection et titré dans les cellules E5 ou M64A, comme décrit précédemment (5). Les cellules E5 ou M64A infectées par HSV-1 sont entretenues dans du milieu 199 (GIBCO) contenant 1% FCS. Les cellules TE-lac2 infectées par HSV-1 ou par le vecteur herpétique sont entretenues dans du milieu DMEM contenant 10 % FCS.

Les vecteurs rétroviraux utilisés en tant que témoins positifs sont produits de manière stable par les cellules TE-GPE (3). Les cellules NIH3T3 sont infectées par ces vecteurs rétroviraux, ou par les vecteurs rétroviraux éventuellement produits par les cellules TE-lac2, dans du milieu DMEM contenant 10 % FCS plus 8 µg/ml de polybrène (SIGMA). Après 12 heures, le polybrène est éliminé du milieu de culture.

Plasmides :

Les plasmides de base utilisés dans ce travail sont le plasmide pSK+ (Stratagène Cloning Systems), pUT535 (CAYLA, Toulouse), pCRIP (6), pAGO (7) et pA-SF1 (8). Ces plasmides ont été produits selon une méthodologie standard (9) dans des bactéries E. coli DH5a (GIBCO).

Biochimie :

Toutes les enzymes de restriction et de modification de l'ADN (Boehringer Mannheim) ont été utilisées suivant les recommandations du fabricant. L'extraction, la purification et l'analyse de l'ADN, viral ou plasmidique, ont été réalisées suivant des procédures standard (9).

Transfection :

Toutes les transfections ont été effectuées par précipitation de l'ADN en phosphate de calcium selon la méthode de Graham et van der Eb (10), suivie d'un choc au glycerol 15 % quatre heures plus tard.

Fixation et coloration X-Gal :

Les cellules transfectées ou infectées par des vecteurs rétroviraux ou herpétiques sont fixées en temps voulu. La présence d'une activité β -galactosidase est mise en évidence par coloration des cellules en utilisant le chromogène X-Gal. La fixation et la coloration des cellules est réalisée comme décrit précédemment (11).

Construction du plasmide pA-HCMV-GPE :

L'unité de transcription permettant l'expression des gènes gag, pol et env sous contrôle du promoteur du gène très précoce du virus cytomégalique humain (IE-

HCMV) et des séquences de polyadénylation du gène de la thymidine kinase (TK) du virus HSV-1 a été construite en plusieurs étapes. Les inventeurs ont d'abord cloné le fragment PvuII/PvuII du plasmide pAGO, contenant le gène TK de HSV-1, dans le site EcoRV du plasmide pSK+, créant ainsi le plasmide pSK-TK. Les inventeurs ont créé par PCR un site BglII dans la région leader du plasmide pCRIP, 36 nucléotides en amont du site donneur d'épissage. Ce site BglII et le site NheI, situé en aval du gène env de pCRIP, ont été utilisés pour cloner les gènes rétroviraux gag, pol et env, entre les sites BglII et MscI du plasmide pSK-TK. Le site BglII se trouve dans le promoteur du gène TK, le site MscI se trouve près de l'extrémité 3' du gène TK. Dans ce plasmide appelé pTK-GPE, les gènes gag, pol et env sont donc sous contrôle du promoteur et du signal de polyadénylation du gène TK. Le plasmide pTK-GPE a été transformé en plasmide pHCMV-GPE après échange du promoteur TK par les séquences de promotion et d'activation du gène IE-HCMV. Pour ceci le fragment SpeI/PstI de pUT535, contenant les séquences de régulation du gène IE-HCMV, a été cloné entre les sites SspI et MluI de pTK-GPE. Le site MluI se trouve dans le promoteur TK. De ce fait la plupart des séquences du promoteur TK disparaissent et sont remplacées par celles du gène IE-HCMV, donnant le plasmide pHCMV-GPE. Finalement, le petit fragment NruI/NruI de pA-SF1, contenant l'origine de réplication (ori-S) et le signal d'encapsidation "a" herpétiques, a été cloné dans le site Eco47III de pHCMV-GPE, donnant lieu au plasmide amplicon pA-HCMV-GPE. Dans les cas où les sites de restriction utilisés pour les clonages ne sont pas compatibles, ils ont été préalablement rendus à bords francs par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'E. coli (9).

Construction du vecteur pA-HCMV-GPE/D30EBA :

Des cellules E5 ou M64A sont transfectées avec 10 µg de pA-HCMV-GPE et surinfectées le jour suivant par HSV-1 D30EBA à une multiplicité d'infection de 1 pfu/cellule. Lorsque l'effet cytopathogène est total, les cellules infectées sont récoltées, centrifugées et reprises dans du milieu 199. Les cellules sont ensuite éclatées par congélation/décongélation rapide dans l'azote liquide, afin de libérer le virus intracellulaire. La moitié du stock viral obtenu est utilisé pour infecter des cellules E5 ou M64A afin d'essayer d'augmenter le titre du vecteur amplicon. Cette opération peut être répétée plusieurs fois consécutives. Les populations virales obtenues sont hétérogènes, car composées de particules vecteurs et de particules auxiliaires (HSV-1 D30EBA). Le nombre de particules auxiliaires est déterminé par titrage sur cellules E5 ou M64A. Le nombre de particules vecteurs ne peut pas être déterminé par titrage, mais il a été estimé de manière approximative par comparaison avec le titre d'un amplicon, dérivé du plasmide pA-SF1, produit en parallèle. La qualité de l'ADN du vecteur amplicon, démontrant qu'il contient l'intégralité des séquences rétrovirales, est vérifiée selon la méthode de Southern (9).

Protocole expérimental : Infection des cellules TE-lac2 comportant le composant rétroviral LTR-ψ-LacZ-LTR :

Des aliquotes du stock de vecteur pA-HCMV-GPE/D30EBA sont utilisées pour infecter des cellules TE-lac2 à faible multiplicité d'infection (moins de 1 pfu/cell de virus auxiliaire). A différents temps post-infection, des aliquotes du surnageant de ces cellules sont prélevées, filtrées sur des filtres Acrodisc (0.2 µm) et utilisées pour infecter des cellules NIH3T3, en présence de polybrène, tel qu'il est décrit plus haut.

Quarante huit heures plus tard, un test X-Gal est réalisé sur les cellules NIH3T3.

Résultats :

Le vecteur amplicon ainsi construit (pA-HCMV-GPE/D30EBA), produit dans les cellules E5 ou M64A avec le virus auxiliaire HSV-1 D30EBA, a été utilisé pour infecter les cellules TE-lac2. Ceci aboutit à l'expression de la composante transcomplémentante dans ces cellules, et à la production et libération de vecteurs rétroviraux dans leur milieu de culture des cellules. Pour montrer cela, des échantillons du milieu de culture des cellules TE-lac2 infectées par cet amplicon ont été testés pour la présence de vecteurs rétroviraux capables d'infecter des cellules NIH3T3 et d'y induire l'expression du gène LacZ (Figure 5). Les inventeurs ont montré que ces vecteurs rétroviraux s'intègrent correctement dans l'ADN cellulaire car il donnent lieu à des foyers des cellules bleues (Figure 6). Dans l'expérience témoin, les inventeurs n'ont pas détecté de vecteurs rétroviraux dans le surnageant des cellules TE-lac2 infectées par le virus herpétique auxiliaire seul (donc en l'absence de la composante transcomplémentante) (Figure 6). La quantité de vecteurs rétroviraux produits par les cellules TE-lac2 est directement proportionnelle à la quantité de vecteur amplicon utilisée pour infecter les cellules TE-lac2, et ceci pendant au moins les trois jours qui suivent l'infection (Figure 7).

Ce résultat montre qu'il est possible d'infecter des cellules par un virus herpétique déficient et faire que ces cellules se mettent à produire des particules rétrovirales, grâce aux protéines Gag, Pol et Env exprimées à partir du vecteur herpétique. Ces protéines semblent être maturées de manière correcte, donnant lieu à la formation de particules rétrovirales

infectieuses. L'infection herpétique n'inhibe pas l'expression de la composante vecteur intégrée dans les cellules TE-lac2. Cet ARN vecteur est incorporé dans les particules rétrovirales formées et les particules ainsi produites sont relâchées dans le milieu de culture et sont infectieuses. Les cellules TE-lac2 infectées par les amplicons GPE produisent des particules rétrovirales pendant au moins deux jours et le titre des vecteurs rétroviraux produits augmente avec la multiplicité d'infection des amplicons.

II. Confirmation de la production de vecteurs rétroviraux par des cellules TE-lac2 infectées par le vecteur herpétique transcomplémentant pA-HCMV-GPE/D30EBA

Le vecteur herpétique transcomplémentant pA-HCMV-GPE/D30EBA a été produit de la manière décrite dans l'exemple I.

1. Expériences de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Des expériences de RT-PCR ont été réalisées afin de démontrer que l'ARN rétroviral présent dans les particules rétrovirales produites par les cellules TE-lac2 infectées, est identique à l'ARN rétroviral synthétisé (mais pas encapsidé) par les cellules TE-lac2 non-infectées.

Pour ces expériences, le surnageant des cellules TE-lac2 a été récupéré, filtré et centrifugé à 1000 rpm. Les surnageants ont été ensuite centrifugés à 35000 rpm pendant 1 heure afin d'obtenir des culots de particules rétrovirales. L'ARN extrait des culots et purifié par phénol/chloroforme a été soumis à une étape de transcription-inverse suivie d'une amplification par

PCR, utilisant deux amorces spécifiques au vecteur rétroviral lacZ (voir figure 8). Un fragment de 977 nucléotides a été détecté, qui est identique à la fois à la bande RT-PCR générée à partir de l'ARN total extrait de cellules TE-lac2 non-infectées, et à la bande PCR générée à partir d'un plasmide contenant le vecteur rétroviral lacZ. Aucun fragment d'ADN n'a pu être détecté à partir des surnageants témoins prélevés de cellules TE-lac2 non-infectées, ou de cellules TE-lac2 infectées par le seul virus auxiliaire D30EBA.

Ces résultats montrent que le génome du rétrovirus défectif lacZ exprimé par les cellules TE-lac2 ne peut être encapsidé qu'après infection de ces cellules par les amplicons GPE.

2. Expériences de neutralisation par anticorps

Des expériences de neutralisation par anticorps ont été réalisées pour confirmer que l'agent inducteur de la formation de particules rétrovirales est un virus herpétique, et que l'agent induit est un rétrovirus écotrope.

Il a été démontré que les anticorps anti-HSV-1 (mais pas les anticorps antirétroviraux) sont capables d'inhiber la synthèse de particules rétrovirales lorsque les vecteurs herpétiques sont mis en contact avec les anticorps avant d'infecter les cellules TE-lac2. Les anticorps anti-rétrovirus (mais pas les anticorps anti-HSV-1) sont capables d'inhiber l'infection des cellules NIH3T3 par les surnageants des cellules TL-lacZ.

Pour ces expériences, les anticorps anti-rétrovirus étaient des antisera de chèvre obtenus contre le virus de la leucémie de Rauscher (RLV), ou contre la protéine RD114 gp70-SU. Les anticorps anti-HSV-1 étaient des immunoglobulines polyclonales purifiées de lapin obtenues contre HSV-1 (B-114, DAKO).

Des immunoglobulines purifiées de lapin, non-immunes (Z-182, DAKO), étaient employées comme témoin. Des anticorps monoclonaux humains et murins spécifiques à la glycoprotéine D (gD) de HSV-1 ont également été utilisés avec des résultats similaires.

Les expériences de neutralisation ont été effectuées en incubant des dilutions de virus, pendant 1 heure à température ambiante, avec des dilutions appropriées de chaque antiserum. Les mélanges virus-sérum ont alors été utilisés pour infecter les cellules cibles correspondantes (TE-lac2 OU NIH3T3).

i) Vecteur herpétique et anticorps anti-HSV-1 en contact avec des cellules TE-lac2

Il a été démontré que la mise en contact préalable du mélange virus herpétique (pA-HCMV-GPE/D30EBA) / anti-HSV-1 (polyclonaux et monoclonaux) avant l'infection de cellules TE-lac2 conduit à l'inhibition de la synthèse de particules rétrovirales. Des anticorps non-spécifiques, ou des anticorps spécifiques du virus RLV (type de MoMLV) ou du virus RD114 ne donnent pas lieu à une inhibition de génération de particules rétrovirales (voir figure 9D, pistes 2 à 5). Ceci démontre que l'agent inducteur est un virus herpétique et non pas un rétrovirus contaminant.

ii) Vecteur rétroviral et anticorps anti-rétrovirus en contact avec des cellules NIH3T3

Des aliquotes du surnageant des cellules TE-lac2 infectées par l'amplicon GPE (pA-CMV-GPE/D30EBA) ont été mis en contact avec des cellules murines NIH3T3 ou humaines TE671 (ATCC CRL 8805), en présence de polybrène (pour améliorer l'efficacité de l'infection rétrovirale). L'expression de β -galactosidase a été déterminée 48 heures plus tard. Les cellules NIH3T3

présentaient des foyers de cellules exprimant lacZ, indiquant que les surnageants utilisés pour effectuer l'infection contenaient des vecteurs rétroviraux lacZ écotropiques. Les cellules TE671 ne présentaient pas de telles colonies.

Les cellules NIH3T3 infectées par des surnageants témoins prélevés de cellules TE-lac2 non-infectées, ou de cellules TE-lac2 infectées par le virus auxiliaire D30EBA, seul, ne présentaient pas d'activité lacZ.

Le caractère écotrope des vecteurs LacZ produits par les cellules TE-lac2 infectées par l'amplicon GPE a été confirmé par des expériences de neutralisation, mettant en oeuvre soit des anticorps dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe écotrope, soit des anticorps contre le rétrovirus RD114 qui appartient à un groupe distinct de récepteurs (référence 13).

Seuls les anticorps spécifiques à la glycoprotéine d'enveloppe écotrope montrent une activité de neutralisation, lorsqu'ils sont ajoutés avant infection de cellules NIH3T3 (figure 9D, pistes 6 et 7). Les anticorps anti-rétroviraux anti-RLV (mais pas les anticorps anti RD114 ou anti-HSV-1) sont capables d'inhiber l'infection des cellules 3T3 par les surnageants des cellules TE-lac2 infectées. Ceci démontre que l'agent induit est un rétrovirus écotope.

3. Vérification, dans le surnageant des cellules TE-lac2 infectées par l'amplicon GPE, de l'absence de vecteurs rétroviraux compétents pour la réplication :

L'expérience suivante a été effectuée afin de confirmer que les surnageants des cellules TE-lac2 infectées par l'amplicon GPE étaient exemptes de vecteurs rétroviraux compétents pour la réplication. En effet, des événements de recombinaison auraient pu éventuellement

conduire à la formation de vecteurs rétroviraux compétents pour la réplication.

Des aliquotes de surnageant ont été mis en contact avec des cellules 3T3-LacZ (ref. 2), exprimant un rétrovirus-LacZ, défectif. La présence de vecteurs rétroviraux capables de transduire l'expression de β -galactosidase dans des cellules NIH3T3 a été testé trois jours plus tard. Aucune formation de vecteurs LacZ n'a pu être observée, indiquant que les vecteurs rétroviraux produits par l'amplicon GPE étaient dépourvus de rétrovirus compétent pour la réplication.

4. Aspects Quantitatifs :

La production de vecteurs amplicons est dépendante de l'utilisation de virus auxiliaire (par exemple D30EBA). Les préparations de vecteurs amplicons sont alors souvent contaminées par la présence de particules de virus auxiliaire.

Les inventeurs ont constaté que plus la proportion de vecteurs amplicon est élevée par rapport à celle du virus auxiliaire, plus les titres de vecteurs rétroviraux obtenus sont élevés. De plus, lorsque le rapport virus auxiliaire : vecteur est enrichi par l'addition expérimentale de particules de virus auxiliaire, on observe une inhibition de la formation de vecteurs rétroviraux, suggérant qu'un excès de virus auxiliaire contaminant peut inhiber la production de rétrovirus. Il est donc possible que la production de vecteurs rétroviraux n'ait lieu que dans les cellules TE-lac2 infectées seulement par des particules amplicon, et non pas dans des cellules co-infectées par une combinaison d'amplicon et de particules auxiliaires (référence 8).

Dans les conditions expérimentales appliquées ici, il est estimé qu'environ 1% des cellules TE-lac2

étaient infectées par le vecteur amplicon seul. Néanmoins, les cultures des cellules TE-lac2 produisent des titres de rétrovirus relativement élevés (supérieure à 10^4 lacZ-CFU/ml - voir Figure 9)

Afin d'optimiser les titres de vecteurs rétroviraux susceptibles d'être obtenus selon l'invention, il est donc avantageux de minimiser, ou d'éliminer, la proportion de virus auxiliaire présente dans la préparation virale. Ceci peut être fait en ayant recours aux techniques connues pour obtenir des préparations dépourvues de virus auxiliaire («helper-free») (Référence 16). Alternativement, des virus auxiliaires ayant subis des modifications supplémentaires pour réduire leur cytotoxicité peuvent être utilisés.

III. Production de vecteurs rétroviraux par infection de cellules TE-GPE par le vecteur herpétique « vecteur » pA-IRV LacZ/D30EBA

1. Construction de plasmide amplicon pA-IRV LacZ

Le plasmide amplicon pA-IRV LacZ (12041 pb), illustré dans la figure 10, a été construit par l'insertion du « module amplicon » herpétique (oriS et « a ») dans le site de restriction ScaI du plasmide pIRV-Neo-Act-LacZ (référence 14). Ce site se situe en aval de la boîte LTR 3'. Le plasmide amplicon pA-IRV LacZ contient les LTR 5' et 3' et les signaux d'encapsidation du MoMuLV, le gène NeoR sous le contrôle du LTR et le gène LacZ sous le contrôle du promoteur de β -actine du rat, et les séquences oriS et « a » herpétiques.

2. Construction du vecteur pA-IRV LacZ/D30EBA

Des cellules M64A sont transfectées avec 10 µg de pA-IRV LacZ, et surinfectées le lendemain par HSV-1 D30EBA. Ensuite, le même protocole que celui mis en oeuvre pour la production du vecteur pA-HCMV-GPE/D30EBA (voir exemple I et figure 4) a été mis en oeuvre, à la seule différence qu'au lieu de transfecter le plasmide pA-HCMV-GPE, l'on a transfecté le plasmide pA-IRV LacZ.

3. Production de vecteurs rétroviraux

Des aliquotes du stock de vecteur pA-IRV LacZ/D30EBA sont utilisées pour infecter des cellules transcomplémentantes TE-GPE, qui ont été construites par intégration, dans les chromosomes des cellules TE671 (ATCC CRL 8805), de deux unités de transcription distinctes, l'une contenant les gènes rétroviraux gag-pol et l'autre contenant le gène env (écotrope). Les trois gènes transcomplémentants appartiennent au virus de la leucémie de Moloney (MoMLV). A différent temps post-infection, des aliquotes de surnageant de cellules TE-GPE infectées par le vecteur amplicon pA-IRV LacZ/D30EBA sont prélevées, filtrées et utilisées pour infecter des cellules NIH3T3, en présence de polybrène, tel que décrit dans l'exemple I. Les cellules NIH3T3 ont été fixées et soumises à un test X-Gal 48 heures après l'infection. Les résultats sont illustrés dans la figure 11.

Les foyers de cellules NIH3T3 bleues montrent que les vecteurs rétroviraux produits par les cellules TE-GPE infectées par pA-IRV-LacZ/D30EBA s'intègrent dans l'ADN cellulaire. Le surnageant de cellules TE-GPE infectées par un amplicon contrôle ne contenant pas de séquences rétrovirales ne donne pas lieu à des foyers bleus lorsqu'il est mis en contact avec des cellules NIH3T3.

IV. Induction de synthèse de vecteurs rétroviraux par un vecteur herpétique portant simultanément les éléments « vecteur » et « transcomplémentant » d'un vecteur rétroviral

Un plasmide amplicon comportant à la fois les éléments rétroviraux « transcomplémentant » et « vecteur » a été construit par l'insertion du module amplicon herpétique (oriS et « a ») dans le plasmide pBMC-6. Ce plasmide est un « plasmovirus » dérivé du plasmide pV-lacZ-env (référence 15), contenant deux unités de transcription distinctes, l'une contenant les gènes Gag, Pol, LacZ et les signaux d'encapsidation, rétroviraux, et l'autre contenant le gène Env sous le contrôle du promoteur HCMV. Le plasmide pBMC-6 contient un gène Env écotrope, tandis que celui de pV-lacZ-env est amphotrope.

La configuration du plasmide amplicon résultant (pA-BMC-6) est la suivante :

LTR-ψ-Gag-Pol-LacZ-LTR//--``a''-oriS--//--prom ENV--

Le plasmide amplicon pA-BMC-6 de 18 kb est ensuite utilisé dans le protocole, tel que décrit dans les exemples I et III, pour produire des vecteurs amplicons dans des cellules M64A en utilisant D30EBA comme virus auxiliaire. Ensuite des cellules TE671 sont infectées par ce vecteur. Le test X-Gal est effectué sur des cellules 3T3 ayant été mises en contact avec le surnageant des cellules TE infectées. Des foyers bleus ont été détectés, confirmant que des particules rétrovirales exprimant lacZ sont présentes dans le surnageant des cellules TE infectées, et que le vecteur rétroviral s'intègre dans le génome des cellules NIH3T3.

Références

1. DeLuca NA, Courtney MA and Schaffer PA (1984). Temperature-sensitive mutants in HSV-1 ICP4 permissive for early gene expression. J Virol 52, 767-776.
2. Takeuchi Y, Cosset FJ, Lachmann PJ, Okada T, Weiss RA and Collins MKL (1994). C-type retroviral inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. J Virol 68, 8001-8007.
3. Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA and Collins MKL (1995). High titer packaging cell producing recombinant retroviruses resistant to human serum. J Virol, 69, in press.
4. Paterson T and Everett RD (1990). A prominent serine-rich region in Vmw175, the major regulatory protein of herpes simplex virus type 1, is not essential for virus growth in tissue culture. J. Gen. Virol 71, 1775-1783.
5. Epstein A, Jacquemont B and Machuca I (1984). Infection of a restrictive cell line (XC cells) by intratypic recombinants of HSV-1: relationship between penetration of the virus and relative amounts of glycoprotein C. Virology 132, 315-324.
6. Danos O and Mulligan RC (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. Proc Natl Acad Sci USA 85, 6460-6464.

7. Colbere-Garapin F, Chousterman S, Horodniceanu F, Kourilsky P and Garapin AC (1979). Cloning of the active thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 3755-3759
8. Lowenstein PR, Fournel S, Bain D, Tomasec P, Clissold P, Castro MG and Epstein A (1994). Herpes simplex virus 1 helper co-infection affects the distribution of an amplicon encoded protein in glia. *NeuroReport* 5, 1625-1630.
9. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular cloning, A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
10. Graham FL and van der Eb AJ (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
11. Dobson AT, Margolis TP, Sedarati F, Stevens, JG and Feldman LT (1990). A latent, non pathogenic HSV-1-derived vector stably expresses beta-galactosidase in mouse neurons. *Neuron* 5, 353-360.
12. Davidson, I., and N. D. Stow, (1985) *Virology*. 141 : 77-88.
13. Sommerfelt, M.A., and R.A. Weiss, (1990), *Virology*. 176 : 58-69.
14. Beddington, R.S., et al., (1989), *Development*, 106 : 37-46.
15. Noguez-Hellin, P et al., (1996), *P.N.A.S.*, 93 : 4175-4180.

16. Fraefei C. et al., J. Virology (1996), 70, 10 ,
7190-7197.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production de vecteurs rétroviraux aptes pour le transfert de séquences d'acide nucléique dans des cellules eucaryotes, caractérisé par l'infection d'une cellule eucaryote par au moins un vecteur viral herpétique, les éléments rétroviraux nécessaires pour l'accomplissement du cycle rétroviral étant fournis soit par le ou les vecteur(s) herpétique(s), soit par le(s) vecteur(s) herpétique(s) en association avec des éléments rétroviraux compris au sein du génome de la cellule eucaryote.

2. Procédé de production de vecteurs rétroviraux aptes pour le transfert de séquences d'acide nucléique dans des cellules eucaryotes, ledit procédé comprenant l'introduction dans une cellule eucaryote d'au moins un composant rétroviral dit "vecteur" et/ou d'au moins un composant rétroviral dit "transcomplémentant", le composant vecteur comportant, outre la séquence à transférer, tous les signaux agissant en cis nécessaires pour l'accomplissement du cycle rétroviral, et le composant transcomplémentant comportant toutes les séquences agissant en trans nécessaires pour l'accomplissement du cycle rétroviral, ledit procédé étant caractérisé en ce que l'introduction du ou des composant(s) rétroviral(aux) dans la cellule est effectuée par l'infection de la cellule par au moins un vecteur viral dérivé d'un virus herpétique et contenant, intégré(s) dans son génome, ledit ou lesdits composant(s) rétroviral(aux), la cellule eucaryote étant alors capable de synthétiser et de relâcher des vecteurs rétroviraux.

3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que le génome du vecteur viral comprend, outre les composants rétroviraux, des séquences génomiques

propres à un virus herpétique et incluant au moins une séquence d'encapsidation et une origine de répllication.

4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que les séquences génomiques propres au virus herpétique comprennent essentiellement la totalité du génome d'un virus herpétique défectif.

5. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que le composant rétroviral transcomplémentant est composé d'au moins une unité de transcription comportant des séquences codant pour les protéines rétrovirales Gag, Pol et/ou Env sous le contrôle de séquences régulatrices de transcription fonctionnelles dans la cellule eucaryote, et est dépourvu de signal d'encapsidation rétrovirale.

6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que les séquences régulatrices comprennent au moins un promoteur fort constitutif d'origine animale ou virale, ou un promoteur spécifique de tissu ou encore un promoteur inductible.

7. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la séquence codant pour Env se trouve au sein d'une unité de transcription indépendante de celle contenant les séquences codant pour Gag et Pol.

8. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que le composant rétroviral vecteur est composé d'au moins une unité de transcription comportant :

- une séquence dite "hétérologue" sous le contrôle de séquences régulatrices de transcription, fonctionnelles dans la cellule eucaryote ;
- des séquences d'origine rétrovirale permettant l'encapsidation du transcrit et sa rétrotranscription ;
- au moins une partie des LTR 5' et 3' d'un rétrovirus, ladite partie conférant la capacité d'encapsidation, de rétrotranscription et d'intégration.

9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que les séquences régulatrices de la transcription sont présentes au sein des LTR 5' et 3' rétroviraux.

10. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que la séquence hétérologue est une séquence codant pour un polypeptide ou une séquence qui, après transcription, donne lieu à une séquence complémentaire d'un produit de transcription endogène à la cellule.

11. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que la séquence hétérologue comprend un gène thérapeutique de maladie à caractère mono- ou multigénique, un gène codant pour une cytokine, un gène suicide, un gène suicide conditionnel, un gène à activité antivirale, un gène à activité antitumorale, un gène thérapeutique de maladie neurodégénérative, ou un gène marqueur.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la cellule eucaryote est une cellule de vertébré, plus particulièrement de mammifère, par exemple des cellules de lignéage hématopoïétiques, cellules souches y compris des cellules souches fibroblastiques, épithéliales, hématopoïétiques et nerveuses, ou des cellules différenciées d'origine ectodermique, mésodermique ou endodermique.

13. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'on introduit dans la cellule eucaryote à la fois un composant rétroviral vecteur et un composant rétroviral transcomplémentant, ces différents composants rétroviraux étant compris, soit dans les génomes de deux vecteurs viraux différents, soit dans le génome d'un seul vecteur viral.

14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un procédé in vivo, in vitro, ou ex vivo.

15. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un procédé in vitro et en ce que l'on introduit dans la cellule eucaryote un seul composant rétroviral, contenu dans le génome du vecteur viral et choisi parmi le composant vecteur ou le composant transcomplémentant, la cellule eucaryote ayant déjà, intégré dans son génome, l'autre des deux composants.

16. Procédé selon la revendication 14 ou 15 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un procédé in vitro et que le procédé comprend en outre une étape de récupération des vecteurs rétroviraux ainsi obtenus.

17. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un procédé ex-vivo et en ce que l'on introduit dans la cellule eucaryote le composant rétroviral vecteur et le composant rétroviral transcomplémentant.

18. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que les séquences rétrovirales proviennent d'un ou plusieurs rétrovirus choisi(s) parmi les rétrovirus de mammifères de type C, par exemple MoMLV, RD114, BaEV, MLV-A ; des rétrovirus de mammifères de type D, par exemple MPMV, SRV ; Spuma rétrovirus, par exemple HFV ; HIV, SIV, ASLV.

19. Molécule d'ADN comprenant :

I : des séquences propres au génome d'un virus herpétique et incluant au moins un signal d'encapsidation et une origine de réplication, et

II : au moins une unité de transcription rétrovirale, ladite unité de transcription comprenant :

- un premier élément constitué de séquences régulatrices de transcription et
- un deuxième élément constitué d'au moins une séquence à transcrire, l'un ou l'autre de ces éléments étant d'origine rétrovirale.

20. Molécule d'ADN selon la revendication 19, comprenant :

I : au moins un signal d'encapsidation et une origine de réplication d'un virus herpétique, et

II : au moins un composant rétroviral constitué de :

i) au moins une unité de transcription dite "unité transcomplémentante" comportant des séquences codant pour les protéines rétrovirales Gag, Pol et/ou Env, sous le contrôle de séquences régulatrices de transcription, fonctionnelles dans une cellule eucaryote, cette unité de transcription étant dépourvue de signaux d'encapsidation rétroviraux et de LTR rétroviraux, et/ou

ii) une unité de transcription dite "unité vecteur" comportant :

- une séquence dite "hétérologue" sous le contrôle de séquences régulatrices de transcription, fonctionnelles dans la cellule eucaryote ;
- une séquence d'origine rétrovirale permettant l'encapsidation du transcrit et sa rétrotranscription ;
- au moins une partie des LTR 5' et 3' d'un rétrovirus, ladite partie conférant la capacité d'encapsidation, de rétrotranscription et d'intégration.

21. Molécule d'ADN selon la revendication 19 ou 20 caractérisée en ce que les séquences propres au génome d'un virus herpétique comprennent essentiellement la totalité du génome d'un virus herpétique défectif.

22. Molécule d'ADN selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'au sein de l'unité transcomplémentante, les séquences régulatrices comprennent au moins un promoteur fort constitutif d'origine animale ou virale, ou un promoteur spécifique de tissu ou encore un promoteur inductible.

23. Molécule d'ADN selon la revendication 22 caractérisée en ce que la séquence codant pour Env se trouve au sein d'une unité de transcription indépendante de celle contenant les séquences codant pour Gag et Pol.

24. Molécule d'ADN selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 caractérisée en ce que dans l'unité vecteur, les séquences régulatrices de la transcription sont comprises au sein des LTR 5' et 3' rétroviraux.

25. Molécule d'ADN selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 caractérisée en ce que la séquence hétérologue est une séquence codant pour un polypeptide ou une séquence qui, après transcription, donne lieu à une séquence complémentaire d'un produit de transcription endogène ou exogène à la cellule.

26. Molécule d'ADN selon l'une quelconque des revendications 20 à 25 caractérisée en ce que la séquence hétérologue comprend un gène thérapeutique de maladie à caractère mono- ou multigénique, un gène codant pour une cytokine, un gène suicide, un gène suicide conditionnel, un gène à activité antivirale, un gène à activité antitumorale, un gène thérapeutique de maladie neurodégénérative, un gène marqueur.

27. Vecteur viral comportant une molécule d'ADN selon l'une quelconque des revendications 19 à 26 encapsidée dans une particule virale dérivée d'un virus herpétique.

28. Cellule eucaryote infectée par un ou plusieurs vecteur(s) viral(aux) selon la revendication 27.

29. Cellule selon la revendication 28 caractérisée en ce qu'il s'agit de cellules de mammifères, et plus particulièrement de cellules humaines, par exemple des cellules de lignéage hématopoïétiques, cellules souches y compris des

cellules souches fibroblastiques, épithéliales, hématopoïétiques et nerveuses, ou des cellules différenciées d'origine ectodermique, mésodermique ou endodermique.

30. Composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur viral selon la revendication 27 en association avec un véhicule acceptable du point de vue physiologique.

31. Composition pharmaceutique selon la revendication 29 caractérisée en ce qu'elle comprend à la fois au moins un vecteur viral "transcomplémentant", et au moins un vecteur viral "vecteur".

32. Composition pharmaceutique selon la revendication 30 caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur viral comportant à la fois un composant rétroviral transcomplémentant et un composant rétroviral vecteur.

33. Vecteur viral selon la revendication 27 pour utilisation en thérapie, particulièrement en thérapie génique.

34. Vecteur viral selon la revendication 27 pour utilisation dans le traitement des maladies suivantes : cancer, maladies d'origine virale telle que le SIDA, maladies à caractère mono- ou multigéniques, maladies neurodégénératives.

35. Utilisation du vecteur viral selon la revendication 27 pour la préparation d'un médicament pour le traitement des maladies suivantes : cancer, maladies d'origine virale telle que le SIDA, maladies à caractère mono- ou multigéniques, maladies neurodégénératives.

36. Procédé de production d'un vecteur viral selon la revendication 27 caractérisé par :

a) la transfection d'une cellule eucaryote avec un plasmide contenant i) une partie du génome d'un virus herpétique, cette partie incluant au moins les signaux

d'encapsidation et une origine de réplication, et ii) une unité de transcription telle que définie dans la revendication 18, et

b) surinfection de la cellule eucaryote avec un virus à ADN auxiliaire, les étapes a) et b) pouvant être remplacées par la co-transfection du plasmide avec le génome du virus auxiliaire,
c) récupération des vecteurs viraux produits par la cellule.

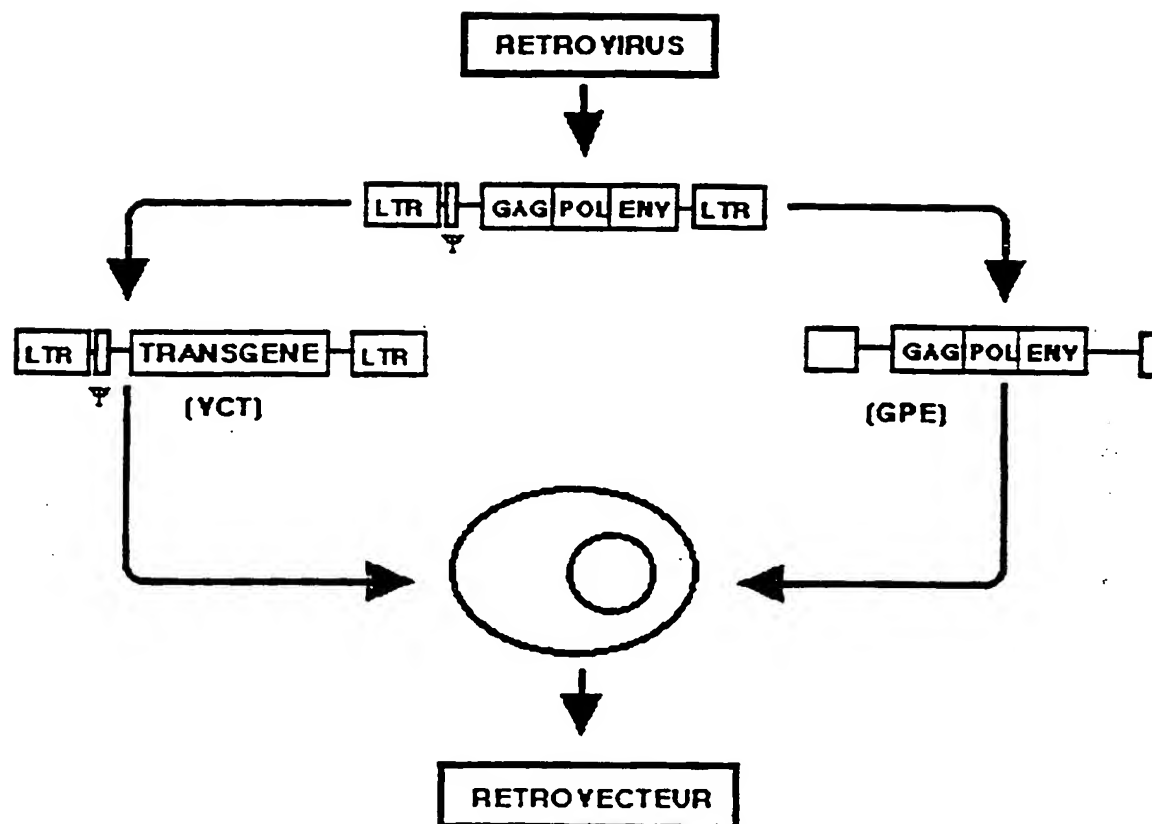
37. Procédé de production d'un vecteur viral selon la revendication 27 caractérisé par :

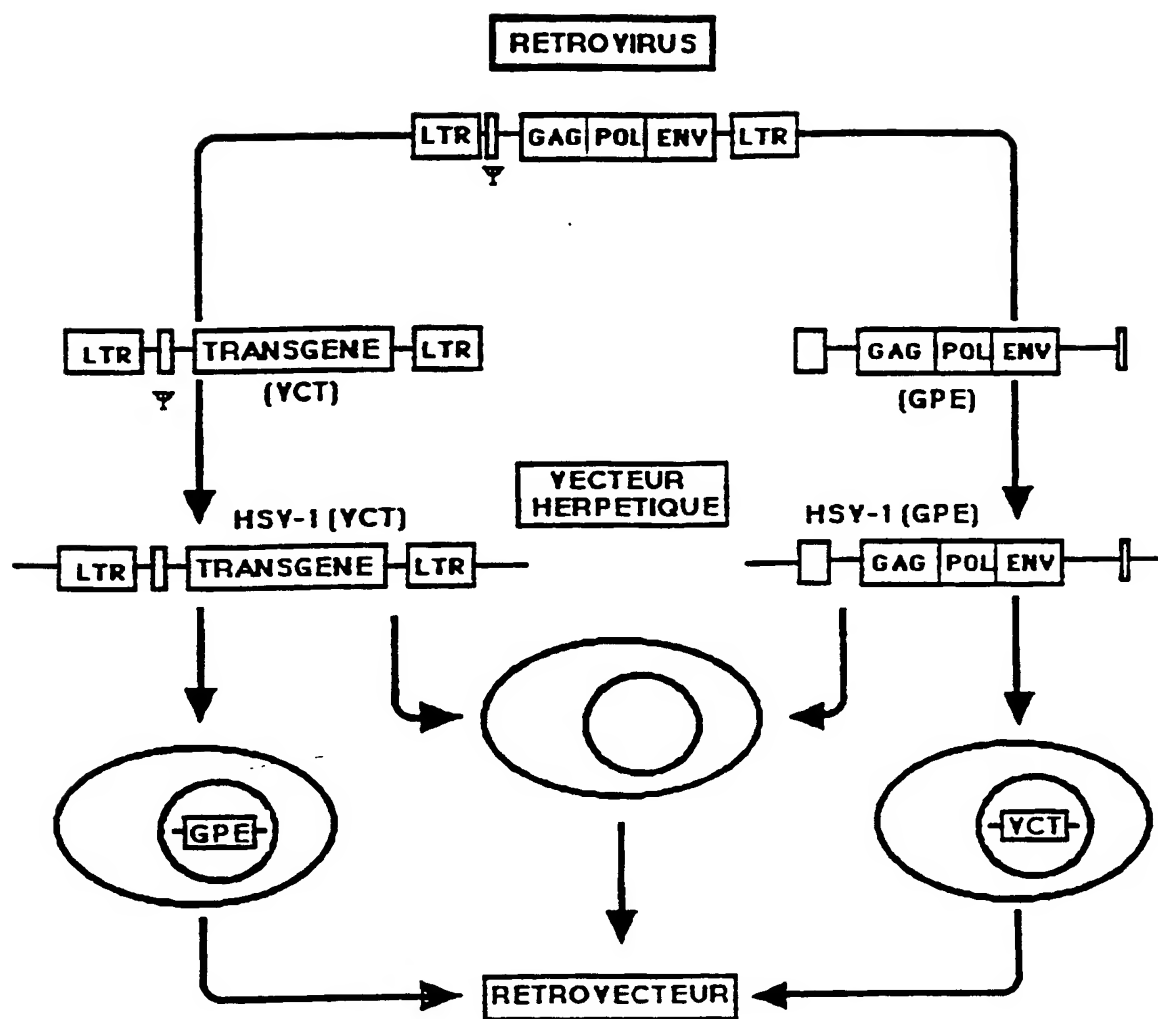
a) la transfection d'une cellule eucaryote avec un plasmide contenant i) une unité de transcription rétrovirale telle que définie dans la revendication 18, et ii) de part et d'autre de cette unité de transcription, des séquences permettant la recombinaison homologue de l'unité avec le génome d'un virus herpétique, et

b) surinfection de la cellule avec le virus à ADN, les étapes a) et b) pouvant être remplacées par la co-transfection du plasmide avec le génome du virus à ADN,
c) récupération des vecteurs viraux produits par la cellule.

1/11

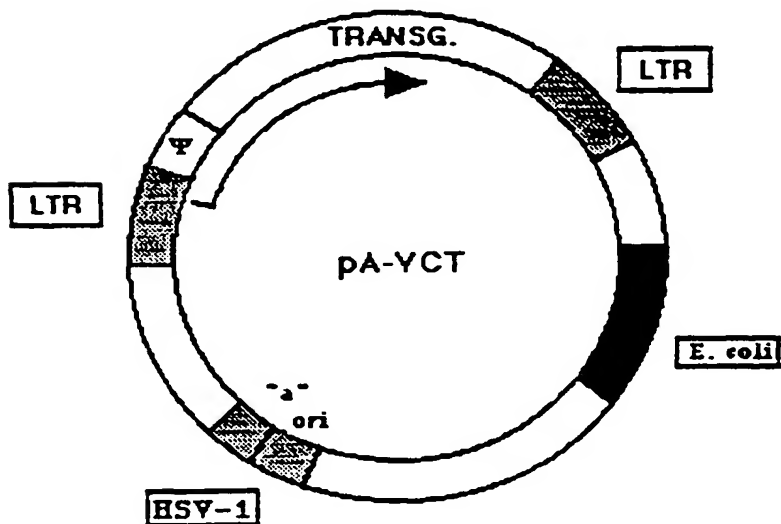
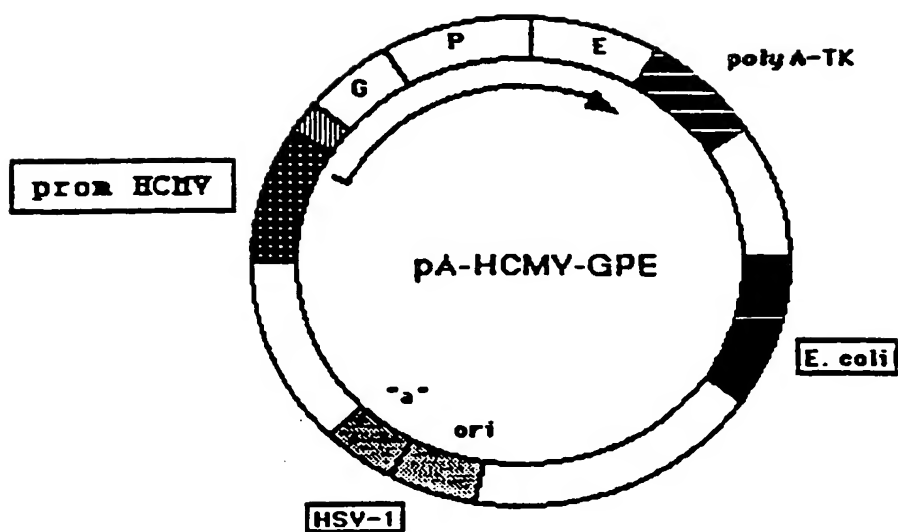
FIGURE 1



2/11
FIGURE 2

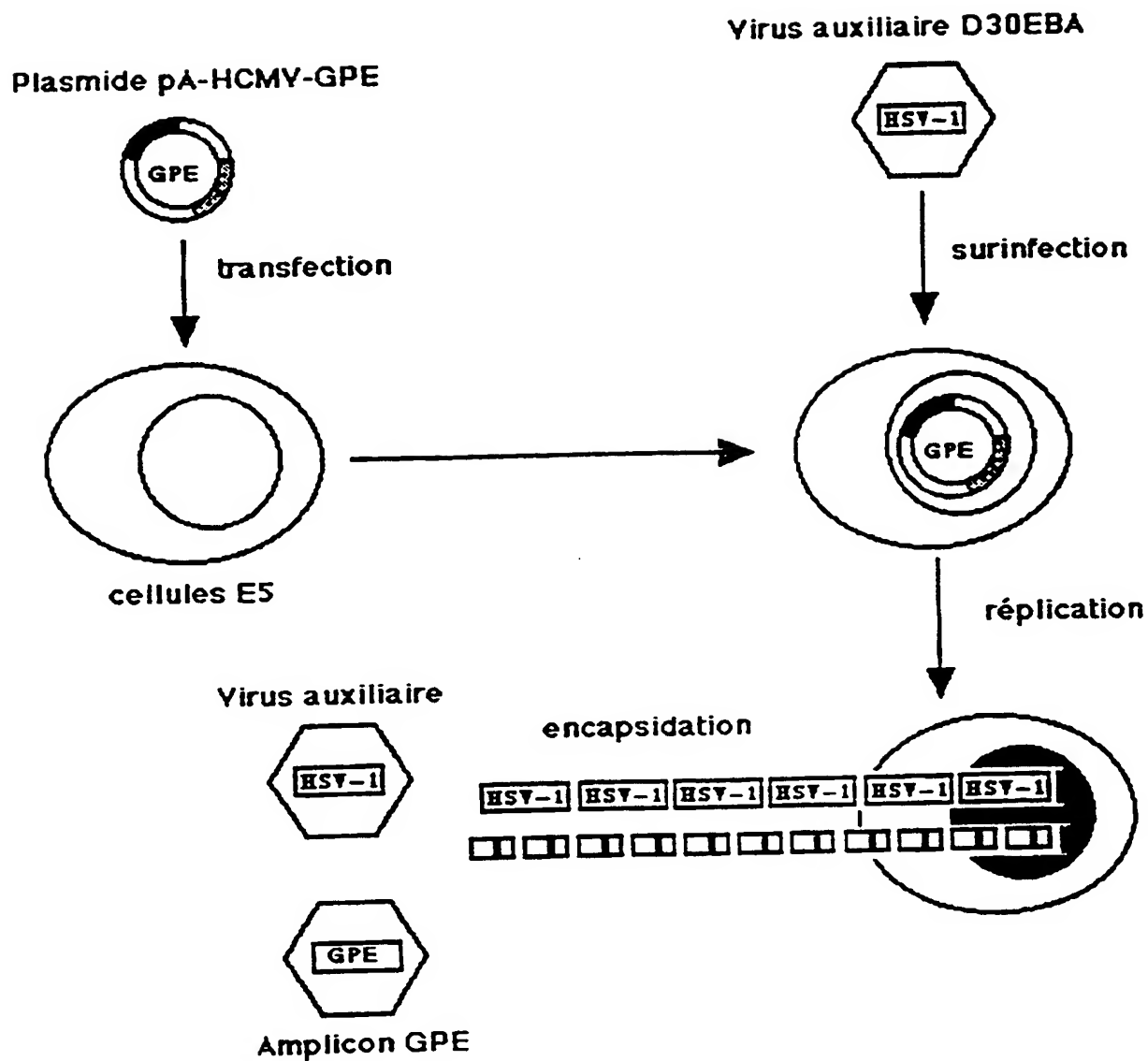
3/11

FIGURE 3



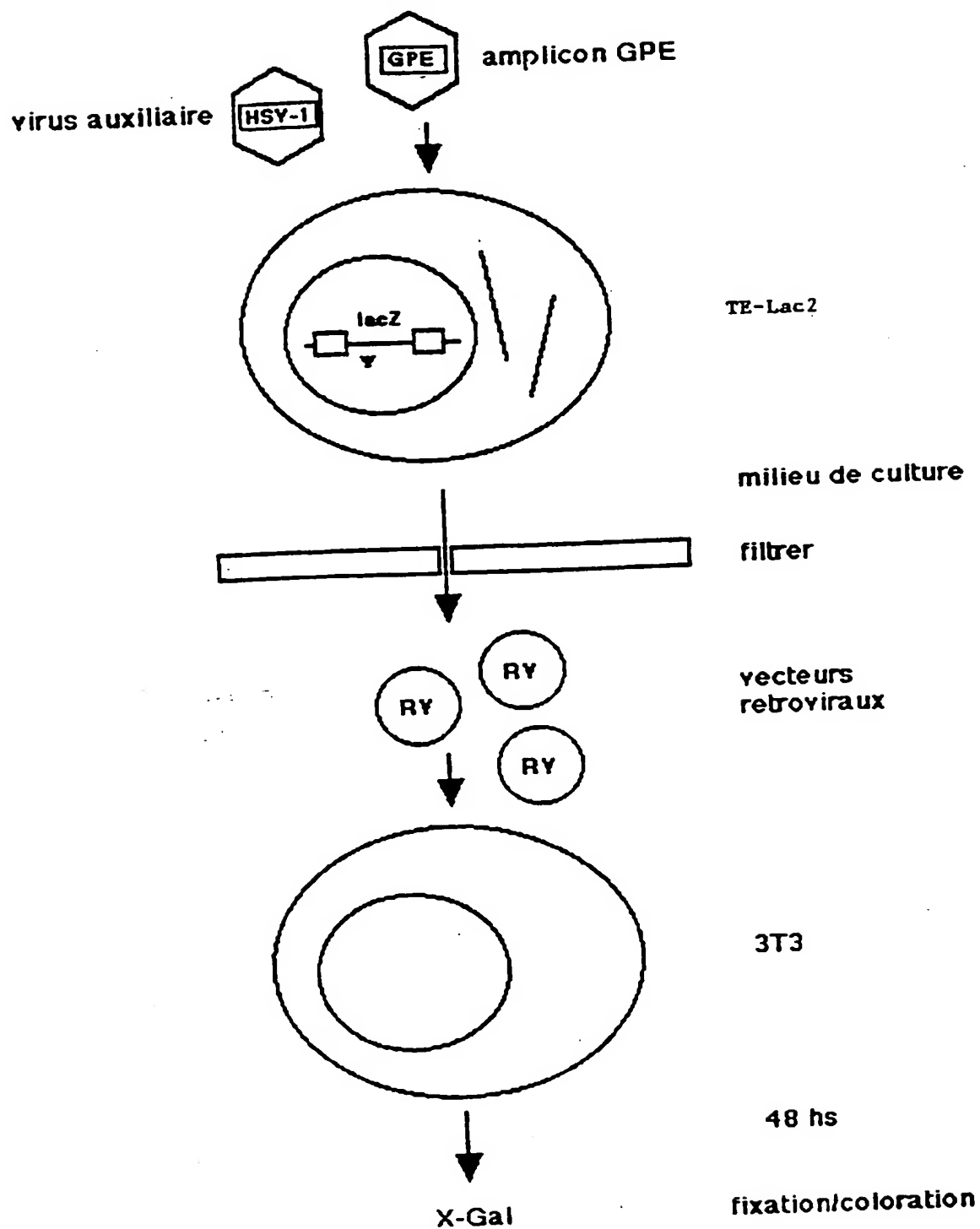
4/11

FIGURE 4



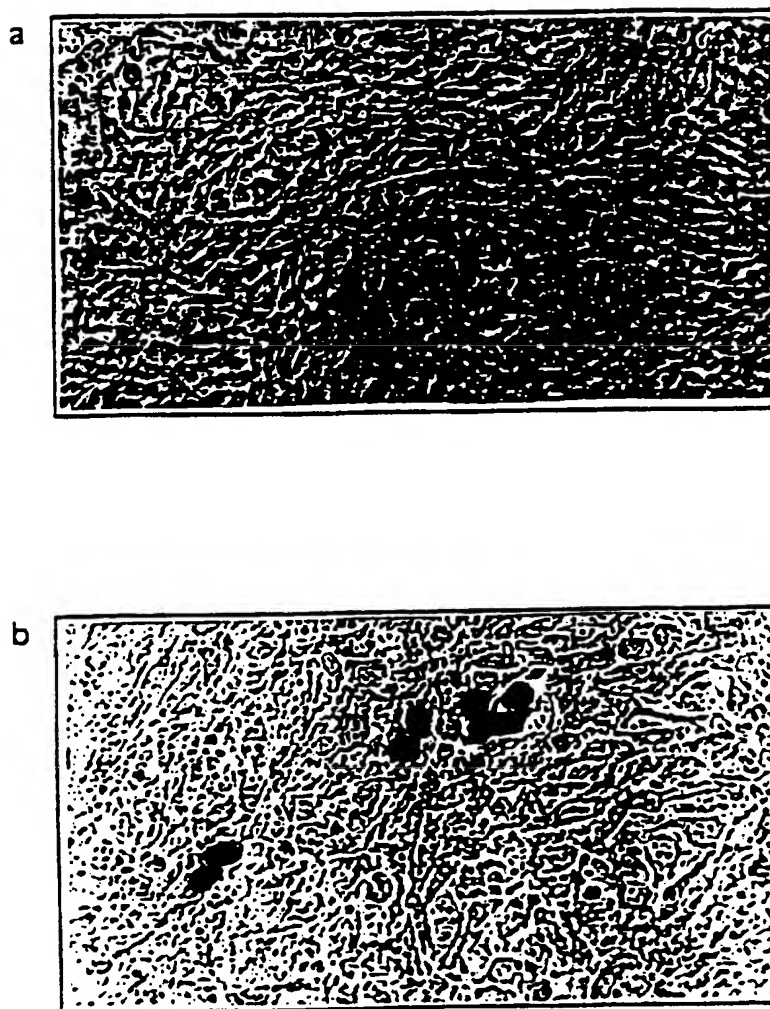
5/11

FIGURE 5



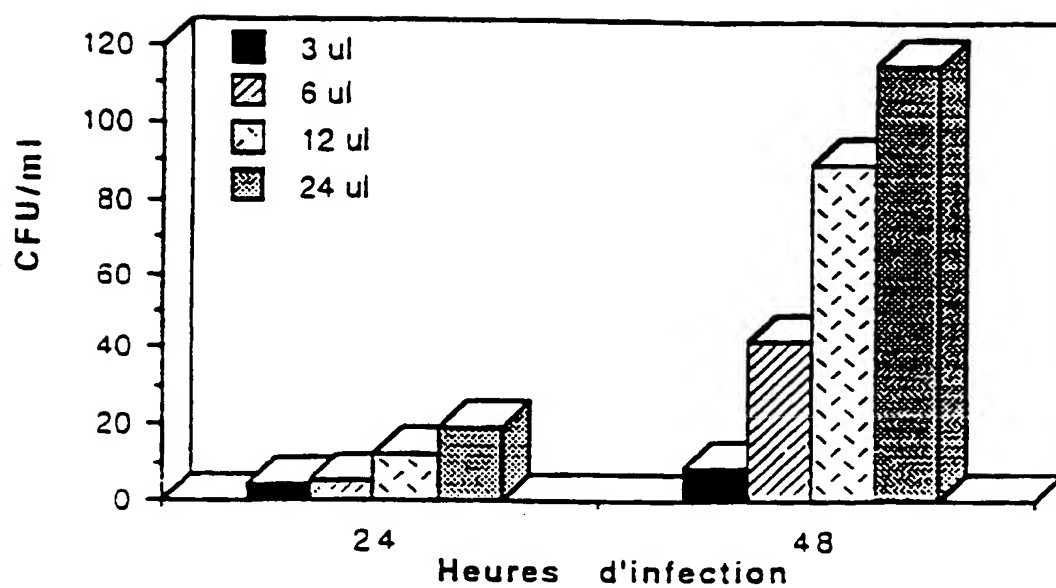
6/11

FIGURE 6



7/11

FIGURE 7



8/11

FIGURE 8a

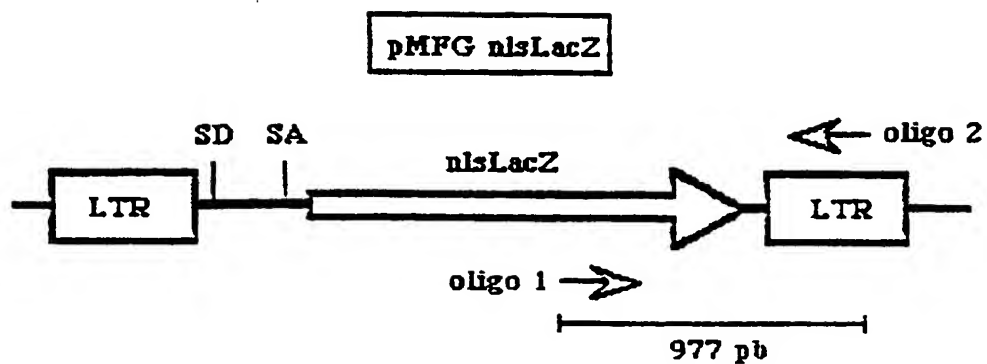
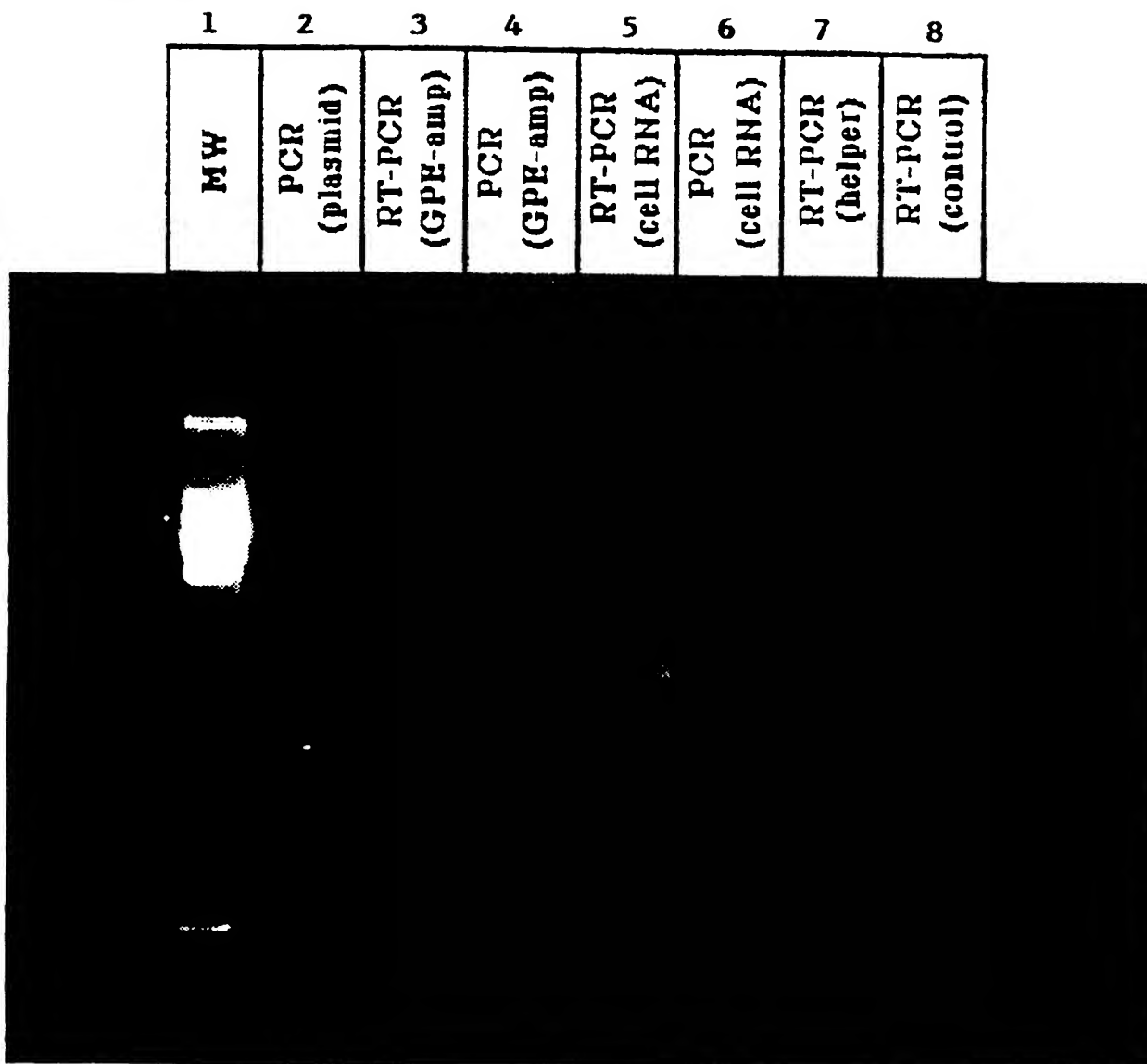
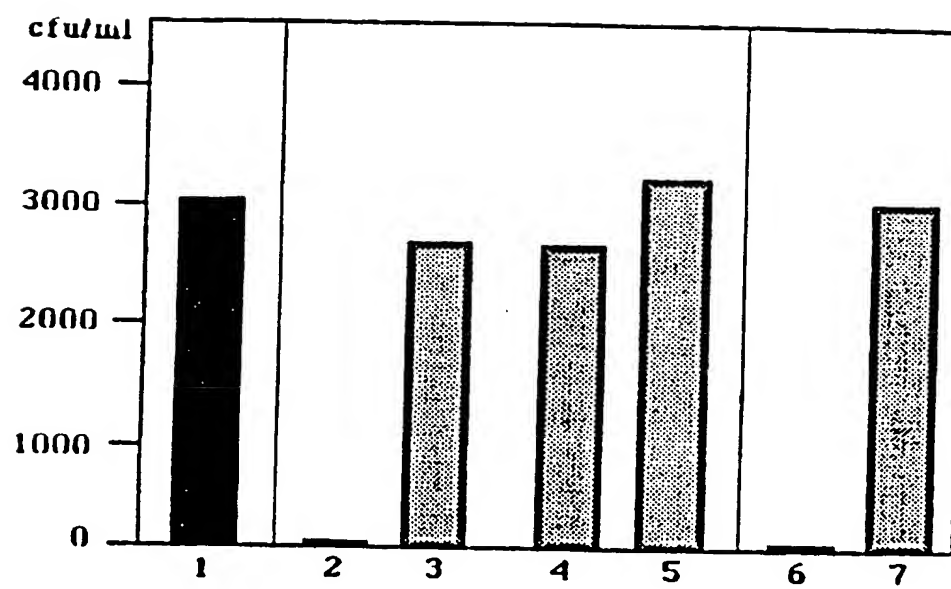


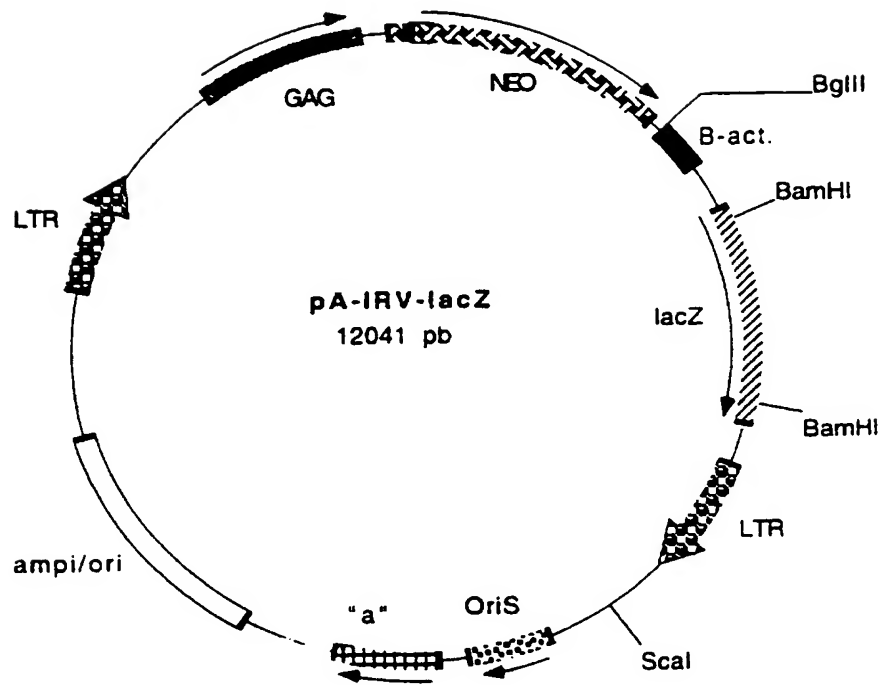
FIGURE 8b



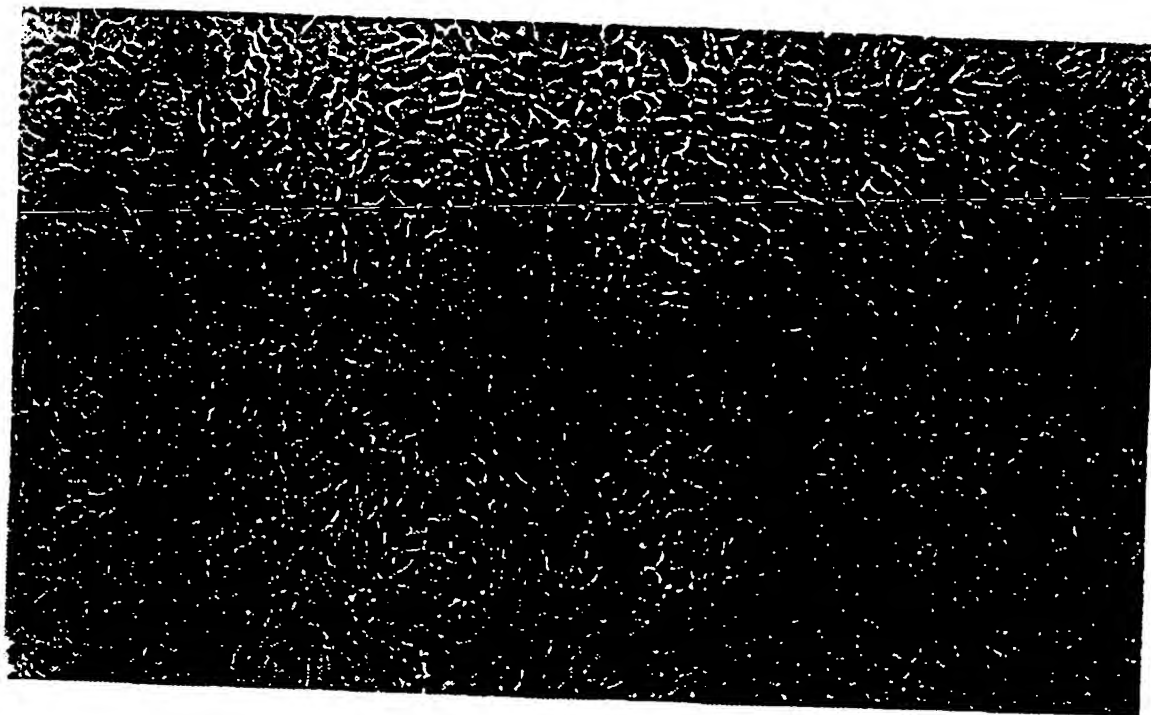
9/11
FIGURE 9



10/11
FIGURE 10



11/11
FIGURE 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/FR 96/01817

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 C12N7/01 A61K48/00 C12N7/04 C07K14/15		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GENE THERAPY, vol. 2, no. suppl, 23 January 1995, page s12 XP000617926 SAVARD, N. ET AL.: "Transient retroviral packaging system generated by Herpes simplex virus derived vectors" voir Résumé 44	1-6,8, 12-17, 19,20, 22, 24-29,33
O,P, X	& Third Meeting of the European Working Group of Human Gene Transfer, Barcelone, Espagne, 11-au 20 Novembre 1995	1-6,8, 12-17, 19,20, 22, 24-29,33
A	--- EP 0 334 301 A (VIAGENE INC) 27 September 1989 see page 19, column 36; claims 42,48 --- -/--	1,7,11, 13,14, 25-35
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*&* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">26 February 1997</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">04. 03. 97</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Chambonnet, F</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/01817

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 19803 A (APPLIED BIOTECHNOLOGY INC) 26 December 1991 see the whole document ---	1
A	WO 95 06743 A (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 March 1995 see the whole document ---	1
A	VIROLOGY, vol. 211, 1 August 1995, ORLANDO US, pages 234-240, XP000578146 FLAMANT, F. ET SAMARUT, J.: "Virofection: A one-step procedure for using" cited in the application see the whole document ---	1
A	GENE THERAPY, vol. 1, no. SUPPL. 01, 16 August 1993, pages S40-S46, XP000574909 FRENKEL N ET AL: "THE HERPES XIMPLEX VIRUS AMPLICON A VERSATILE DEFECTIVE VIRUS VECTOR" ---	3
P,A	WO 96 06177 A (CONNAUGHT LAB ;ROVINSKI BENJAMIN (CA); CAO SHI XIAN (CA); YAO FEI) 29 February 1996 see claims 32,56-65 ---	1
P,A	WO 96 09399 A (SOMATIX THERAPY CORP) 28 March 1996 see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 96/01817

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although this Claim is directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the product (composition).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No
PCT/FR 96/01817

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0334301 A	27-09-89	AU 651311 B	21-07-94
		AU 3364089 A	16-10-89
		CH 684094 A	15-07-94
		CN 1038306 A	27-12-89
		EP 0702084 A	20-03-96
		GB 2236753 A,B	17-04-91
		GB 2254424 A,B	07-10-92
		GB 2255777 A,B	18-11-92
		IL 89701 A	31-07-95
		JP 3504079 T	12-09-91
		WO 8909271 A	05-10-89
		US 5591624 A	07-01-97
WO 9119803 A	26-12-91	NONE	
WO 9506743 A	09-03-95	AU 7565694 A	22-03-95
WO 9606177 A	29-02-96	AU 3249195 A	14-03-96
WO 9609399 A	28-03-96	AU 3551195 A	09-04-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PC1/FR 96/01817

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 C12N7/01 A61K48/00 C12N7/04 C07K14/15		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GENE THERAPY, vol. 2, no. suppl, 23 Janvier 1995, page s12 XP000617926 SAVARD, N. ET AL.: "Transient retroviral packaging system generated by Herpes simplex virus derived vectors" voir Résumé 44	1-6,8, 12-17, 19,20, 22, 24-29,33
O,P, X	& Third Meeting of the European Working Group of Human Gene Transfer, Barcelone, Espagne, 11-au 20 Novembre 1995	1-6,8, 12-17, 19,20, 22, 24-29,33
A	EP 0 334 301 A (VIAGENE INC) 27 Septembre 1989 voir page 19, colonne 36; revendications 42,48	1,7,11, 13,14, 25-35

-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 26 Février 1997		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 04. 03. 97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCI/FR 96/01817

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 91 19803 A (APPLIED BIOTECHNOLOGY INC) 26 Décembre 1991 voir le document en entier ---	1
A	WO 95 06743 A (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 Mars 1995 voir le document en entier ---	1
A	VIROLOGY, vol. 211, 1 Août 1995, ORLANDO US, pages 234-240, XP000578146 FLAMANT, F. ET SAMARUT, J.: "Virofection: A one-step procedure for using" cité dans la demande voir le document en entier ---	1
A	GENE THERAPY, vol. 1, no. SUPPL. 01, 16 Août 1993, pages S40-S46, XP000574909 FRENKEL N ET AL: "THE HERPES XIMPLEX VIRUS AMPLICON A VERSATILE DEFECTIVE VIRUS VECTOR" ---	3
P,A	WO 96 06177 A (CONNAUGHT LAB ;ROVINSKI BENJAMIN (CA); CAO SHI XIAN (CA); YAO FEI) 29 Février 1996 voir revendications 32,56-65 ---	1
P,A	WO 96 09399 A (SOMATIX THERAPY CORP) 28 Mars 1996 voir le document en entier -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande internationale n°

PCT/FR 96/01817

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°s 14 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Pour autant que cette revendication concerne une méthode de traitement du corps humain/animal in vivo, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. ☐ Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dém: Internationale No
PCT/FR 96/01817

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0334301 A	27-09-89	AU 651311 B AU 3364089 A CH 684094 A CN 1038306 A EP 0702084 A GB 2236753 A,B GB 2254424 A,B GB 2255777 A,B IL 89701 A JP 3504079 T WO 8909271 A US 5591624 A	21-07-94 16-10-89 15-07-94 27-12-89 20-03-96 17-04-91 07-10-92 18-11-92 31-07-95 12-09-91 05-10-89 07-01-97
WO 9119803 A	26-12-91	AUCUN	
WO 9506743 A	09-03-95	AU 7565694 A	22-03-95
WO 9606177 A	29-02-96	AU 3249195 A	14-03-96
WO 9609399 A	28-03-96	AU 3551195 A	09-04-96

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)